

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Liisi Talas

**Seenekoosluste tuvastamine jääajajärgsetest järve põhjasetetest 18S rDNA ja
ITS2 ala järjestuste põhise meetodiga**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendaja molekulaarbioloogia vanemteadur Veljo Kisand, PhD

Tartu Ülikool, Tehnoloogiainstituut

TARTU 2016

Seenekoosluste tuvastamine jääajajärgsetest järve põhjasetetest 18S rDNA ja ITS2 ala järjestuste põhise meetodiga

Lühikokkuvõte. Järve põhjasetetest seente mitmekesisuse ja ökoloogilise rolli hindamiseks kasutati ajaloolisele DNAle optimeeritud PCRi koos ITS2 ja 18S rDNA ala praimeritega. Seente mitmekesisuse ja liigrikkuse hindamiseks arvutati Chao1, Shannon-Weaver ja tasakaaluindeksid. Kokku tuvastati 343 seente perekonda, mis kuulusid 8 hõimkonda. Domineerivateks hõimkondadeks olid *Basidiomycota* ja *Ascomycota*. Universaalsete 18S rDNA praimerite abil tuvastati lisaks taimi (sh okaspuid), loomi ja protiste. Okaspuude esinemist järve ümbruses toetab *Pinus* ja *Picea* taimeperekonna parasiitsete seente tuvastamine settest ITS2 ala abil. Ökoloogiliselt rollilt esines tuvastatud seente seas rohkelt taimeparasiite, taimeseoselisi seeni ja saprotroofe. Esines ka putukate parasiite, koprofiilseid ja seenparasiitseid seeni. Paleoolustiku rekonstrueerimiseks ja organismidevaheliste seoste leidmiseks osutus tulemuslikuks kasutada ITS2 ja 18S rDNA ala koos.

Märksõnad. paleolimnologia, mükoloogia, 18S rDNA ja ITS2 ala, PCR optimeerimine, teise põlvkonna sekveneerimine

CERCS kood. B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; B260 Hüdrobioloogia, mere-bioloogia, veeökoloogia, limnoloogia; B300 Paleobotaanika, fülogenees, palünoloogia

Assessment of fungal diversity in post-glacial lake sediment by sequences of ITS2 and 18S rDNA region

Abstract. The diversity and role of fungi in ancient lacustrine sediment was studied by optimized PCR using 18S rDNA and ITS2 region primers. The diversity and species richness of the fungi was calculated using the Chao1, Shannon-Weaver and Evenness indices. Total of 343 genera of fungi belonging to 8 different phyla were detected. *Basidiomycota* and *Ascomycota* were the most dominant phyla of fungi. Plants (incl. conifers), animals and protists were also detected by the universal 18S rDNA region primers. Appearance of the conifers around the lake during historical course was supported by the presence of plant-parasitic fungi associated with genera *Pinus* and *Picea* as detected by analysis ITS2 region. Identified fungi revealed diversity of plant-parasitic, plant-associated and saprotrophic fungi. Also insect-parasitic and fungal-parasitic fungi occurred. Using both (ITS2 and 18S rDNA) regions allows to find relationships between organisms and partly reconstruct the past biota.

Keywords. paleolimnology, mycology, 18S rDNA and ITS region, PCR optimization, next generation sequencing

CERCS code. B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; B260 Hydrobiology, marine biology, aquatic ecology, limnology; B300 Paleobotany, phylogeny, palynology

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
Sissejuhatus	5
1 Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Seened järve ökosüsteemis	6
1.1.1 Seened kui orgaanilise aine lagundajad ja nitrifitseerijad	6
1.1.2 Seente interaktsioonid teiste organismidega	7
1.2 Paleolimnooloogilised uurimismeetodid	8
1.2.1 Klassikalised paleolimnoloogilised meetodid	9
1.2.2 Molekulaarsed DNA-põhised meetodid	10
2 Töö eesmärgid ja hüpoteesid	15
3 Materjalid ja meetodid	16
3.1 Proovide kogumine	16
3.2 Dateerimine	17
3.3 DNA ekstraheerimine ja PCRi optimeerimine	18
3.4 Sekveneerimisandmete töötlus ja analüüs	21
4. Tulemused	25
4.1 PCRi optimeerimine	25
4.2 Sekveneerimistulemuste kvaliteet	29
4.3 Liigirikkus ja mitmekesisus	31
4.4 Seente elukeskkond ja ökoloogiline roll	36
5. Arutelu	41
Kokkuvõte	47
Assessment of fungal diversity in post-glacial lake sediment by ITS2 and 18S rDNA region primer approach	48
Tänuavaldused	49

Kasutatud kirjandus	50
Lisa 1. Analüüsiks kasutatud proovid.....	57
Lisa 2. FIMMi protokoll.....	59
Lisa 3. PCRi optimeerimisel koostatud protokoll seenekoosluste tuvastamiseks..	61
Lisa 4. Andmestikest tuvastatud OTUde arvud ja suuremad taksonoomilised grupid.....	63
Lisa 5. OTUde ja lugemite suhe erinevates andmestikes	64
Lisa 6. Chao1 ja ACE indeksid	65
Lisa 7. Nonlinear Mixed-Effects Models tulemused.....	67
Lisa8. 18S rDNA ala abil kirjeldatud liigrikkus.....	68
Lisa 9. OTUde arvu, Shannoni ja Evenessi indeksite muutused erinevates proovides.	69
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	70

Kasutatud lühendid

ACE	ingl k <i>Abundance Coverage Estimator</i> , indeks liigirikkuse hindamiseks
BSA	ingl k <i>Bovine Serum Albumin</i>
DMSO	ingl k <i>dimethylsulfoxide</i> , dimetüül sulfoksiid
E_H (J)	Shannoni tasakaaluindeks, Pielou's J
EtBr	ingl k <i>ethidium bromide</i> , etiidiumbromiid
FIMM	ingl k <i>Institute for Molecular Medicine Finland</i>
H'	Shannon-Weaveri indeks
LCA	ingl k <i>last common ancestor</i> , viimane ühine eellane
LSU	ingl k <i>large subunit</i> , ribosoomi suur subühik
NCBI	ingl k <i>National Center for Biotechnology Information</i> , molekulaarbioloogia andmebaas organismide taksonoomilise kuuluvuse määramiseks
OTU	ingl k <i>operational taxonomic units</i>
SILVA	ribosomaalsete RNA järjestuste andmebaas
SSU	ingl k <i>small subunit</i> , ribosoomi väike subühik
UNITE	ingl k <i>User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database</i> , ribosomaalse DNA järjestuste andmebaas seente tuvastamiseks

Sissejuhatus

Seened on organismid, mis on tuvastatavad pea kõikvõimalikest keskkondadest ja on seotud väga erinevate organismidega (Wurzbacher jt., 2010). Seened võivad järvedes lagundada taimset materjali (Ali ja Abdel-Raheem, 2003), elada sümbioosis (Romani jt., 2006) või parasiteerida erinevatel organismidel (kalad, vetikad, taimed, fütoplankton, seened) (Wurzbacher jt., 2010; Gleason jt., 2011; Kagami jt., 2007; van Geel jt., 2006). Järve põhjasetetes on aga seente roll ja mitmekesisus peaaegu täiesti uurimata valdkond (Wurzbacher jt., 2010). Seeneliikide mitmekesisuse abil on võimalik rekonstrueerida mineviku kliimat, floorat ja faunat. Toetavaks infoks on teiste organismide paleoindikaatorite samaaegne esinemine. Mineviku-keskkonna kohta kindlaks tehtud info võimaldab hinnata nii inimõju, kliimamuutusi, loomastiku kui ka taimestiku muutusi uuritavas piirkonnas (Pedersen jt., 2014).

Siiani on paleolimnoloogilised uuringud järve põhjasetetest keskendunud õietolmu ja teiste palünomorfide analüüsile (van Geel jt., 2003; Pedersen jt., 2013). Samas võimaldab PCR ja sekveneerimistehnoloogia üha realistlikumalt hinnata organismide mitmekesisust ja liigirikkust molekulaarbioloogiliste meetodite abil (Bellemain jt., 2013; Monard jt., 2013). Ajaloolise DNA ja õietolmu analüüsi andmete kõrvutamine võimaldab selgemat ülevaadet liikide esinemisest ja taimestiku muutustest paleokeskkonnas (Pedersen jt., 2013).

Seente mitmekesisuse DNA-põhiseks tuvastamiseks on oluline amplifitseeritava ala valik (Bellemain jt., 2010). Seente tuvastamiseks on enim kasutatud ribosomaalse RNA 18S geeni (18S rDNA) ja ITS piirkondi (Bellemain jt., 2013; Lydolph jt., 2005; Wurzbacher jt., 2010). Mitmed uurimused (Schoch jt., 2012; Singh jt., 2012) on soovitanud kasutada kombinatsiooni ITS2 ala praimeritest või ITS2 ja 18S rDNA piirkonna praimereid koos. Seetõttu otsustasin uurida 18S rDNA ja ITS2 ala valiku mõju seente mitmekesisuse ja rolli tuvastamisele jääaja-järgsetest järve setetest.

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli Läti järve Lielais Svetinu paleolimnoloogilise andmestiku täiendamine molekulaarbioloogiliste meetodite abil 18S rDNA ja ITS2 ala praimereid kasutades. Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi keskkonnamikrobioloogia grupis.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Seened järve ökosüsteemis

Seente koosluste uuringud on oluline osa keskkonnateadustest, kuna seened on väga erinevate ökosüsteemide osaks. Seisuveekogudes (nt järved) on seene koosluste struktuuri suhteliselt vähe uuritud ning seente roll järve erinevates piirkondades vaid osaliselt teada. Samas on seni avaldatud uuringutest selgelt näha seente seost järve toiduvõrgustiku dünaamikaga, mistõttu võib arvata, et seened mängivad olulist rolli toitainete ja süsinikuringes ning interaktsioonides teiste organismidega (Wurzbacher jt., 2010; Gleason jt., 2011).

1.1.1 Seened kui orgaanilise aine lagundajad ja nitrifitseerijad

Veeseened lagundavad järvedes polümeerseid orgaanilisi aineid nii veesambas (nt kinnitudes hõljuvale lehemassile) kui ka settes (Ali ja Abdel-Raheem, 2003). Nad toodavad suures hulgas erinevaid ekstratsellulaarseid ensüüme (tsellulaasid, pektinaasid, hemitsellulaasid), mis võimaldavad neil lagundada keerulisi orgaanilisi aineid (ligniini, tselluloosi ja hemitselluloosi) (Romani jt., 2006; Singh jt., 2011). Üheks tõhusaks ensüümide grupiks on lakaasid. Lakaasid on võimelised oksüdeerima fenoolseid ja mitte-fenoolseid aromaatsaid ühendeid. Lakaase on kirjeldatud enim ligniinilagundavatel valge- ja pruunmädanikku põhjustavatel seentel. *Basidiomycetes* hõimkonda kuuluvatest seentest on sellised *Trametes versicolor* ja *Ascomycetes* hõimkonda kuuluvatest liikidest *Podospora anserina* (Singh jt., 2011). Sellised ensüümid lõhuvad taimse materjali väiksemateks assimileeritavateks molekulideks (Romani jt., 2006), mis on oluliseks toiduallikaks veekeskkonna toiduvõrgustikus. Seente ja bakterite suhteline panus süsinikuringesse võimaldab hinnata ka settes leiduva orgaanilise süsiniku vanust (Mouton jt., 2012).

Praktiliselt uurimata valdkond on aga järve põhjasettes elutsevad või settes fossiliseerunud seene kooslused. Edgcomb jt (2011) on näidanud, et mere põhjasettes on seened bakterite ja protistide kõrval kõige arvukamad organismid. Kõige suurem eukarüootne mitmekesisus leiti olevat mere sette pindmistes kihtides, kus seentest domineerisid saprotroofe sisaldavad hõimkonnad *Ascomycota* ja *Basidiomycota* (Singh jt., 2012; Edgcomb jt., 2011). Medeiros jt (2009) on näidanud, et lahustunud hapniku kontsentratsiooni langus limiteerib lehemassi lagundavate seente aktiivsust. Samas on näidatud, et seened on aktiivsed ka anaeroobses keskkonnas, kus nad

osalevad denitrifitseerimisel (Mouton jt., 2012). Denitrifitseerimisel redutseeritakse nitraate nitrititeks ja lõpp-produktiks kujunevad kasvuhoonegaasid NO_2 või N_2O (Cathrine ja Raghukumar, 2009). Selline seente poolt läbiviidav protsess leiab aset väga madala hapnikusisaldusega keskkonnas, samas kui bakterite poolt läbiviidav denitrifikatsioon vajab täielikult hapnikuvaba (anoksilist) keskkonda. Lisaks denitrifikatsioonile viivad seened läbi ka ko-denitrifitseerimist, mille käigus seened produtseerivad N_2 või N_2O hübriidmolekule. Seentel on tuntud ka hapnikuta keskkonnas (hapnikupuuduses) ammooniumi fermentatsioon (ammonifikatsioon). Sel juhul redutseerivad seened nitraate (NO_3^-), mille tulemusel produtseeritakse ammooniumioone NH_4^+ (Cathrine ja Raghukumar, 2009). Nii osalevad seened lämmastikuringe erinevates etappides (Mouton jt., 2012). Arvatakse, et see võib olla mütseeliumiga seentel strateegiaks erinevates keskkondades ellujäämiseks (Cathrine ja Raghukumar, 2009). Nii sõltub seente mitmekesisus nende ruumilisest paiknemisest settes.

Orgaanilise aine lagundamisel ja süsinikuringes osalevad peale seente veel algloomad, bakterid ja arhed. Nad kõik konkureerivad üksteisega koloniseeritava või lagundatava materjali üle (Lindblom jt., 2006; Romani jt., 2006). Kuid lagundatav materjal pole ainuke elukeskkond seentele. Seened võivad asustada ka teisi organisme (Lindblom jt., 2006; Romani jt., 2006).

1.1.2 Seente interaktsioonid teiste organismidega

Konkurents erinevate elupaikade üle on viinud seente ja teiste organismide vaheliste vastasmõjude tekkeni (Lindblom jt., 2006; Romani jt., 2006). Seened võivad osaleda erinevates liikidevahelistes suhetes nagu sümbioos, mutualism, kommensalism ja parasitism (Lindblom jt., 2006; Romani jt., 2006; Gleason jt., 2011; Kagami jt., 2007). Lisaks sümbiootilistele suhetele seente ja taimede vahel, on samasugust vastasmõju kirjeldatud ka seente ja bakterite vahel. On täheldatud, et lehejäänuste lagundamisel kasvavad bakterid paremini siis, kui koosluses esinevad ka seened. Põhjuseks võib pidada taimemassi lagundamisel tekkivate laguproduktide kasulikkust bakteritele (Lindblom jt., 2006; Romani jt., 2006). Seened võivad olla ka parasiitideks paljudele organismidele nagu kalad, selgrootud, taimed, vetikad ja fütoplankton (William ja Strongman, 2013; Ishida jt., 2015; Gleason jt., 2011; Kagami jt., 2007). Ishida jt (2015) näitasid, et peamiselt vees elutsevate *Chytridiomycota* hõimkonna esindajate hulka kuulub mitmeid fütoplanktoni parasiite, ränivetikatel esines aga *Cryptomycota* ja pärmide esindajaid. See ja mitmed teised uurimused annavad tunnistust väga mitmekesisest seenparasiitidest. Lisaks parasiteerimisele teistel organismidel, võivad seened olla parasiitideks ka teistel seentel. Van Geel jt (2006)

kirjeldas hüperparasitismi mikro- ja makrofossiilides, kus hüperparasiit *Isthmospora spinosa* esines koos oma peremehe askomütseedi *Meliola ellisii*'ga. *Meliola ellisii* oli ise omakorda parasiidiks kanarbikul (*Calluna vulgaris*). Varem oli selliseid uuringuid limiteerinud sobivate meetodite puudus, kuid tehnoloogia arenguga on üha paremini võimalik tuvastada organismide vahelisi suhteid.

Seente mitmekesisust ja rolli käsitlevad uuringud (Edgcomb jt., 2011; Medeiros jt., 2009; Lindblom jt., 2006; Romani jt., 2006; Gleason jt., 2011) kannavad olulist informatsiooni veekeskonna ja järve ümbritsevate koosluste kohta. Seente ja teiste organismide vaheliste seoste kaudu on võimalik tuvastada järve ümbruses paiknenud floorat, faunat ja vees elutsevaid organisme. Lydolph jt (2005) tuvastasid Kirde-Siberi külmunud pinnasest (~10 m sügavuselt) nii külmale adapteerunud pärme, taimeparasiite, samblike mükobionte kui ka taimede ja selgrootute DNAd. Taimeseoseliste seente mitmekesisuse muutused viimasel jääajal võimaldasid hinnata ka taimekoosluste muutusi. Samuti leiti koprofiilseid seeni, mis näitab võimalikku seost suurte herbivoorsete loomadega. Nii on, kasutades keskkonna DNAd, saadud informatsiooni möödunud aja flora ja fauna mitmekesisuse kohta (Pedersen jt., 2014). Seega võimaldab pinnases ja veekogude põhjasetteis leiduva DNA analüüs anda infot ajalooliste elustikukoosluste kohta.

1.2 Paleolimnoloogilised uurimismeetodid

Settesse kuhjunud mikro- ja makrofossiilid on klassikaliste paleolimnoloogiliste uuringute põhiobjektiks (van Geel jt., 2003). Suur osa settesse mattunud organismidest ja nende jäänustest aga ei fossiliseeru, kuid võib jätta settesse endast ekstratsellulaarse DNA jälgi (Pedersen jt., 2014) või hoopis laguneda keskkonnatingimuste (oksüdatiivsed radikaalid, radiatsioon, endogeensed nukleasid) toimel (Brown ja Barnes, 2015). Ekstratsellulaarne DNA settes on seotud savimineraalide, laetud orgaaniliste molekulide ja huumusosakeste külge, mis kaitsevad DNAd keskkonnas paiknevate nukleasid eest. Säilinud DNAd on võimalik tuvastada molekulaarseid meetodeid kasutades (Pedersen jt., 2014). Nii on säilinud eukarüootse DNA põhjal rekonstrueeritud varasemate ajaperioodide koosluste mitmekesisust. Enamasti on uuritud taimede ja loomade DNAd jääst, järvesetest, pindmistest mullakihtidest. (Pedersen jt., 2014; Pedersen jt., 2013). Seenekoosluste tuvastamine on järvede paleolimnoloogilistes uuringutes jäänud suurema tähelepanuta (Wurzbacher jt., 2010). Samas on aga välja toodud, et andmed keskkonnas säilinud DNA ja klassikaliste paleolimnoloogiliste indikaatorite kohta täiendavad

teineteist, võimaldades tuvastada suuremat organismide liigilist mitmekesisust kui vastavad andmestikud eraldi käsitletutena (Pedersen jt., 2013). Nii on üha enam kasutatud paleolimnoloogilistes uurimustes (Parducci jt., 2013; Pedersen jt., 2013) nii klassikalisi paleolimnoloogilisi meetodeid kui ka DNA-põhiseid molekulaarseid meetodeid (Fernandes jt., 2015).

1.2.1 Klassikalised paleolimnoloogilised meetodid

Klassikalised paleolimnoloogilised meetodid põhinevad õietolmu ja mitte-õietolmu palünomorfide mikroskoopilisel tuvastamisel ja arvukuse loendamisel.

1.2.1.1 Mikroskoopia meetod palünomorfide määramiseks

Palünomorfid on settes säilinud erinevad mikro- ja makrofossiilid, mis omavad orgaanilisest ainest (kitiin, sporopolleniin) kesta nagu õietolm, seenespoorid, vetikate spoorid, tsüanobakterite jäänused (van Geel jt., 2003; Miras jt., 2015; Fernando, 2015). Tolmuterasid ja seenespoore ümbritsev kest kaitseb neid lagundamise eest settes (Fernando, 2015; van Geel jt., 2003).

Õietolmu- ja mitte-õietolmu mikroskoopiline analüüs viiakse läbi tolmuterade ja spooride morfoloogia alusel (van Geel jt., 2003; Miras jt., 2015). Tolmutera pinnareljeefi (pooride vagude, mügarate, piikide, servade jms) alusel on võimalik identifitseerida neid tootnud taimi perekonna või sugukonna tasemel (Fernando, 2015). Ka seenespoore suudetakse tuvastada väliskihi struktuuri alusel. Seetõttu on õietolmu ja mitte-õietolmu palünomorfe kasutades võimalik osaliselt rekonstrueerida taimestiku muutuseid tuhandete aastate jooksul ja hinnata nende muutuste järgi inimõju rolli ja ulatust (kariloomade pidamine, maaviljelus, eutrofeerumine) (van Geel jt., 2003).

1.2.1.2 Radiosüsinikumeetod sette kihtide vanuse määramiseks

Settekihtide vanuse määramiseks kasutatakse radiosüsiniku meetodil dateerimist (ingl k *radiocarbon dating*). Radiosüsinikuga ajamääramise meetod kasutab orgaaniliste säilmete vanuse määramiseks süsiniku looduslikult esinevat radioisotoopi ^{14}C . Taimede ja loomade kudedes sisaldub ^{14}C umbes samas proportsioonis kui seda on atmosfääris. Pärast vaadeldavate organismide surma hakkab ^{14}C lagunema kindla kiirusega. Proovis esinevat alles jäänud ^{14}C hulka võrreldakse kunagise eeldatava atmosfääri ^{14}C -ga, mis võimaldab määrata uuritava proovi vanust (Fernando, 2015).

1.2.2 Molekulaarsed DNA-põhised meetodid

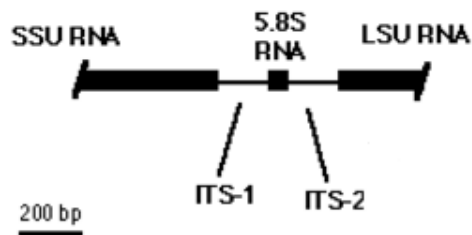
Seente spooride ja hüüfijäänuste analüüs võimaldab meil vaid osaliselt määrata seente mitmekesisust uuritavas settes. Peale seene spooride, hüüfide, mikrofossiilide, leidub settes ka rohkemal või vähemal määral lagunenud DNAd. DNA säilimine keskkonnas on võimalik tänu DNA molekulide seostumisele savimineraalidega või muude laenguid omavate orgaaniliste molekulidega. Sel viisil adsorbeerunud DNA on kaitstud keskkonnas paiknevate nukleasidest eest (Pedersen jt., 2014). Samuti arvatakse, et DNA lagundamine on pärsitud anaeroobses ja külmas keskkonnas, kuna seal on takistatud oksüdatiivsed ja temperatuurist sõltuvad hüdrolyüütilised lagundamisprotsessid (Brown ja Barnes, 2015; Hofreiter jt., 2001). DNA-põhiseid meetodeid kasutades on võimalik tuvastada nii mineraalide koostises säilinud DNAd (Pedersen jt., 2014) kui ka mittekultiveeritavaid liike, mis mikroskoopilisi meetodeid kasutades jääksid tuvastamata (Fernandes jt., 2015).

DNA-põhised molekulaarsed meetodid põhinevad polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR), kus liigispetsiifiliste praimeritega amplifitseeritakse sihtmärgiks olevate geenide järjestusi. Tulemuseks saadakse uuritava geeni järjestused miljonites koopiates (Wurzbacher jt., 2010). Varasemates uuringutes on kasutatud „sõrmejäljemeetodit“ PCR järjestusmuustrite analüüsiks. Sõrmejäljemeetod võimaldab võrrelda koosluste mustreid ja seeläbi hinnata koosluse mitmekesisust (Anderson ja Cairney, 2004; Wurzbacher jt., 2010). Laialdaselt on kasutusel olnud ka kloonide sekveneerimisel põhinevad meetodid (Singh jt., 2012; Lydolph jt., 2005; Vankov ja Keen, 2009; Anderson ja Cairney, 2004). Kloonide sekveneerimise meetod põhineb PCRi amplikoni ligeerimises vektorisse ning selle transformeerimises *E.colisse*. Tulemuseks saadakse kloonide raamatukogud, mis seejärel sekveneeritakse. Sekveneerimise teel tuvastatakse kloonide nukleotiidsed järjestused, mida on võimalik identifitseerida järjestuste võrdlemisel järjestusi sisaldava andmebaasi vastu (Singh jt., 2012; Vancov ja Keen, 2009). Kloonide sekveneerimine on aga väga töö- ja ajakulukas meetod (Singh jt., 2012; Lydolph 2005). Seega võimaldab see korraga vaid piiratud arvu kloonide tuvastamist võrreldes uute sekveneerimistehnoloogiate läbilaskevõimega (Singh jt., 2012; Bellemain jt., 2013). Sekveneerimistehnoloogiate arenguga on liikide tuvastamine muutunud vähem töömahukaks ja kiiremaks. Kõrge lugemite arvuga teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiad võimaldavad tuvastada keskkonnast suuremas hulgas erinevaid organisme (Bellemain jt., 2013).

Teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiate kasutuselevõttuga on suudetud tunduvalt edukamalt hinnata ja tuvastada organismide mitmekesisust ajaloolistes setetes (Bellemain jt., 2013; Monard jt., 2013; Orsi jt., 2013). Seetõttu kasutatakse viimasel ajal ka seenekoosluse tuvastamiseks enim teise põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaid, mis võimaldavad otseselt PCRi produktide sekveneerimist (Bellemain jt., 2013; Fernandes jt., 2015). Keskkonnaproovidest seenekoosluste tuvastamiseks PCRi abil on vajalikud markergeenideks sobivad genoomialad ja neile vastavad järjestusepõhised praimerid. Praimerite disainimiseks on enim levinud ribosomaalse DNA piirkonna kasutamine. Seente ribosomaalse DNA regioon sisaldab kõrgelt varieeruvaid alasid, mistõttu kasutatakse seda DNA piirkonda seente taksonoomiliseks identifitseerimiseks (Wurzbacher jt., 2010).

1.2.2.1 Ribosomaalse DNA piirkond

Eukarüootne rDNA genoomi piirkond sisaldab 18S, 5.8S ja 28S rRNA gene, mille vahel paiknevad mittetransleeritavad ITS (ingl k *internal transcribed spacer*) alad (Schoch jt., 2012). (Joonis 1). rRNA väikse subühiku (18S, SSU) geenide järjestusi kasutatakse enim eukarüootse mitmekesisuse tuvastamiseks (Anderson ja Cairney, 2004).



Joonis 1. rRNA geenid koos nende vahele jäävate mittekodeeritavate ITS aladega (muudetud Vilgalys LAB, Mycology, Duke University).

Seente spetsiifiliste praimerite disainimisel on põhiliseks eesmärgiks luua praimerid, mis suudaksid amplifitseerida erinevatesse taksonoomilistesse gruppidesse kuuluvaid seeni. Samas aga ei tohiks praimerid ko-amplifitseerida lähedalt suguluses olevaid liike, vaid peaksid suutma ka neid eristada. 18S rDNA alale seente spetsiifiliste praimerite disainimisel on probleemiks lisaks seente DNAle ka teiste eukarüootide DNA amplifitseerumine. See tuleneb 18S rRNA geenijärjestuse kõrgest sarnasusest eukarüootide vahel. Samas on 18S rDNA piirkonnale loodud mitmeid laialdaselt kasutuses olevaid universaalseid primereid (Anderson ja Cairney, 2004). Anderson ja Cairney (2004) on välja toonud tabeli eukarüootsetest praimeritest, mida on

kasutatud nii mulla, meresette kui ka paleoloogilistes uuringutes (Singh jt., 2012; Lydolph jt., 2005; Orsi jt., 2013).

18S rDNA piirkonna praimereid on kasutatud mitmetes seene koosluse uuringutes. Singh jt (2012) näitasid 18S rRNA geeni piirkonna praimereid kasutades, et seened on teiste eukarüootide seas domineerivaks grupiks meresetetes. rRNA väikse subühiku geenipiirkonda on eelistanud ka Orsi jt (2013), kes tõendas samuti seente domineerivust süvamere ülemistes sette kihtides. Seetõttu võib arvata, et anaeroobses keskkonnas on seente DNA piisaval määral säilinud, et uurida seente mitmekesisust ja seoseid teiste organismidega ka sügavamatest kihtidest. Nii on 18S rRNA geenide amplifitseerimist kasutanud ka üks väheseid seente paleoloogilisi uuringuid Beeringi mere külmunud pinnasest (Lydolph jt., 2005), mille eesmärgiks oli vaadelda seente mitmekesisust kuni 400 000 aasta vanuses paleokeskkonnas. Tänu 18S rDNA piirkonna universaalsete praimerite kasutamisele amplifitseeriti kõiki suurematesse riikidesse kuuluvaid organisme (seened, loomad, taimed). Lydolph jt (2005) näitas, et pinnasest tuvastati nii saprotroofseid ja koprofiilseid seeni kui ka taime parasiite (perekonna tasemel). Koprofiilsete seente esinemine tõendas megafauna olemasolu. Erinevate domineerivate taime perekondade esinemine erinevatel sügavustel andis tunnistust taimestiku muutusest kindlatel ajaperioodidel (Lydolph jt., 2005). Nii on 18S rRNA geeni piirkonda kasutatud meresette ja paleoloogilistes seene koosluste uuringutes (Singh jt., 2012; Orsi jt., 2013; Lydolph jt., 2005). 18S rDNA piirkonna praimerite kasutamine võimaldab hinnata kogu eukarüootset mitmekesisust ja võimalikke seoseid erinevate gruppide vahel (Orsi jt., 2013; Lydolph jt., 2005).

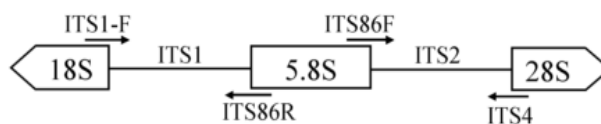
Samas on aga näidatud 18S rDNA piirkonna praimerite amplifitseerimise eelistust mõningate suuremate seenegruppide suhtes (Anderson ja Cairney, 2004). Singh jt (2012) näitasid 18S rDNA piirkonna praimerite (NS1/NS2, 18S-42F/Univ1492RE ja EK555F/EK1269R) suuremat spetsiifilisust seente gruppide *Ascomycota* ja *Basidiomycota* suhtes. Samas gruppide *Zygomycota* ja *Chytridiomycota* puudus tulenes arvatavasti kasutatud praimerite madalast spetsiifilisusest nende gruppide järjestuste suhtes (Singh jt., 2012). Praimerite kallutatus kindlate taksonoomiliste gruppide poole tuleneb ka amplifitseerimiseks valitavast materjalist. Samblikke moodustavate seente tuvastamine 18S rDNA piirkonna praimeritega oli äärmiselt madal, kuna praimerid eelistasid fotobionti seenele (Schoch jt., 2012). Seetõttu on äärmiselt tähtis sobiva praimeri valik.

18S rDNA piirkonna põhiliseks probleemiks on tema piiratud eristusvõime perekonna ja liigi tasemel. Põhjuseks on 18S rDNA ala geenide ebapiisav varieeruvus lähedalt suguluses olevate

liikide vahel (Schoch jt., 2012; Anderson ja Cairney, 2004). See tuleneb 18S rDNA piirkonna aeglasest evolutsioneerimise kiirusest võrreldes mõnede teiste rRNA geeni aladega. ITS võiks olla sobivam piirkond seente identifitseerimiseks. ITS ala võimaldab tänu järjestustes esinevatele rohketele variatsioonidele eristada ka lähedalt suguluses olevaid liike. (Anderson ja Cairney, 2004). Samas aga sobivad 18S rDNA praimerid arbuskulaarse mükoriisa liikide tuvastamiseks, kuna neil esineb 18S rRNA geeni järjestustes piisavalt varieeruvust nende liikide tasemel eristamiseks (Anderson ja Cairney, 2004). 18S rDNA piirkonna kõrval on ITS ala kõrgelt varieeruv nii nukleotiidide järjestuses, järjestuse pikkuses kui ka rRNA geenide amplifitseerimise efektiivsuses (Schoch jt., 2012). Seepärast on ITS ala enim kasutusel seente taksonoomiliseks tuvastamiseks.

1.2.2.2 ITS piirkond

ITS (ingl. k. *internal transcribed spacer*) on multikoopiaalne rRNA suure ja väikse subühiku geenide vaheline mittekodeeritav piirkond, mis seetõttu võimaldab amplifitseerida ka madala DNA kontsentratsiooniga proove (Monard jt., 2013). ITS ala pikkus varieerub tugevalt, jäädes vahemikku 450-750 aluspaari (Blaalid jt., 2013; Monard jt., 2013). Seente ITS regioon sisaldab kolme piirkonda: ITS1 ala, 5.8S rRNA geen ja ITS2 ala (Joonis 2). ITS1 ja ITS2 alad on väga variatsioonide rohked ja võimaldavad seetõttu seeni eristada ka liikide tasemel. Nende vahel paiknev 5.8 rDNA piirkond on aga äärmiselt konserveerunud ja seepärast ei kasutata seda piirkonda liikide identifitseerimiseks (Blaalid jt., 2013).



Joonis 2. rRNA geenid koos nende vahele jäävate mittekodeeritavate ITS aladega (Vancov ja Keen, 2009). Uurimistöodes kasutatud (Vancov ja Keen, 2009; Blaalid jt., 2013; Monard jt., 2013) praimerid ITS1 ja ITS2 piirkonna amplifitseerimiseks

ITS järjestuse sobivust marker-alana on näidanud ka Schoch jt (2012). Ta tõi välja, et võrdluses SSU, LSU ja mõnede valku kodeerivate geenipiirkondadega oli ITS ala kasutamisel amplifitseerimise ja sekveneerimise edukus parim. Samuti esines ka selgelt eristatav tühimik liikide kauguse analüüsis, mis näitab võimet eristada erinevaid seenegruppe. Võrreldes teiste rDNA aladega esines ITS ala kasutades suurem liikide identifitseerimise edukus gruppides *Basidiomycota* ja *Ascomycota*. Kuna *Ascomycota* ja *Basidiomycota* on suurimad seente

taksonoomilised grupid, siis on nendest hõimkondadest liikide identifitseerimine oluline realistlikuma mitmekesisuse tuvastamiseks (Schoch jt., 2012).

Samas on teada, et paljud laialdaselt kasutusel olevad ITS praimerid (Anderson ja Cairney, 2004) eelistavad amplifitseerimisel kindlat gruppi seente järjestusi, millele on praimerid disainitud (Monard jt., 2013; Schoch jt., 2012). See loob aga proovis esinevast mitmekesisusest eksliku ettekujutuse. Nii on mitmetes seene koosluste uuringutes (Monard jt., 2013; Bellemain jt., 2010) toodud välja amplifitseeritava ala ja praimerid valiku mõju koosluste tuvastamisele. Monard ja kolleegid (2013) näitasid ITS1 ja ITS2 regiooni valiku mõju. Nad tõid välja, et kahe ITS lookuse spetsiifilist praimerit kasutades, olid mõlema praimeriga tuvastatavad vaid $\frac{1}{3}$ OTUdest (Monard jt., 2013). ITS1 ala kasutades suudeti näidata suurem seente mitmekesisus kui ITS2 ala praimereid kasutades. Samas aga toodi välja, et ITS1 ala amplifitseerimiseks kasutatud praimer ITS1F toodab suures hulgas valepaardumisi, mis suurendab näilikult mitmekesisust (Bellemain jt., 2010). ITS2 ala on aga soovitanud kasutada Vancov ja Keen (2009), Fernandes jt (2015), Nilsson jt (2009), Tedersoo jt (2015) jpt. Nilsson jt (2009) on põhjenduseks välja toonud seisukoha, et ITS2 ala allavoolu regioon (LSU), võrdluses ITS1 ala omaga (5.8S), on tunduvalt kasulik liikide tuvastamisel. Seda seepärast, et 5.8S ala on väga konserveerunud võrreldes LSU-ga (Nilsson jt., 2009). Samuti annab UNITE andmebaas ITS2 järjestuste blastimisel rohkem tulemusi (Blaalid jt., 2013). Vastupidiselt Monardi (2013) uurimusele näitasid ka Vancov ja Keen (2009), et ITS2 alaga tuvastati rohkematesse hõimkondadesse kuuluvaid seeni kui ITS1 ala kasutades. Samas oleneb liikide identifitseerimise ulatus kasutatavatest praimeritest (Blaalid jt., 2013; Tedersoo jt., 2015). Seetõttu on seente mitmekesisuse uuringutes tähtsal kohal amplifitseerimiseks valitavad praimerid, mis peavad olema küll spetsiifilised liigile, kuid samas universaalsed uuritava grupi piires (Vancov ja Keen, 2009).

Kuigi ITS piirkonnale on disainitud palju erinevaid universaalseid seente praimereid (Anderson ja Cairney, 2004), siis Schoch jt (2012) soovivad seeneriigi geneetilise mitmekesisuse tõttu kasutada kombinatsiooni erinevatest praimeritest (Schoch jt., 2012). Samuti kasutasid Tedersoo jt (2015) ITS2 ala amplifitseerimisel kombinatsiooni päripidistest praimeritest ITS3tagmix (ITS3mix1, ITS3mix2, ITS3mix3, ITS3mix4, ITS3mix5) ja äraspidisest ITS4ngs praimerist. Selline praimerite kombinatsioon andis kõige suurema OTUde arvu proovides (Tedersoo jt., 2015). Sama meetodikat soovib järgida ka Singh jt (2012), kes kasutasid süvamere sette mitmekesisuse hindamiseks nii 18S rDNA kui ka ITS piirkonnale disainitud praimereid.

2 Töö eesmärgid ja hüpoteesid

Käesoleva töö põhieesmärgiks oli täiendada paleolimnoloogilist andmestikku seenekoosluste DNA-põhise tuvastamise abil.

Töö teiseks eesmärgiks oli koostada DNA-põhise meetodi protokoll seenekoosluste tuvastamiseks järve põhjasetetest, kasutades selleks PCR abil paljundatud markergeene (18S rDNA ja ITS2 regioone).

Kolmandaks otsustati uurida 18S rRNA ja ITS2 regiooni valiku mõju seene mitmekesisuse tuvastamisele.

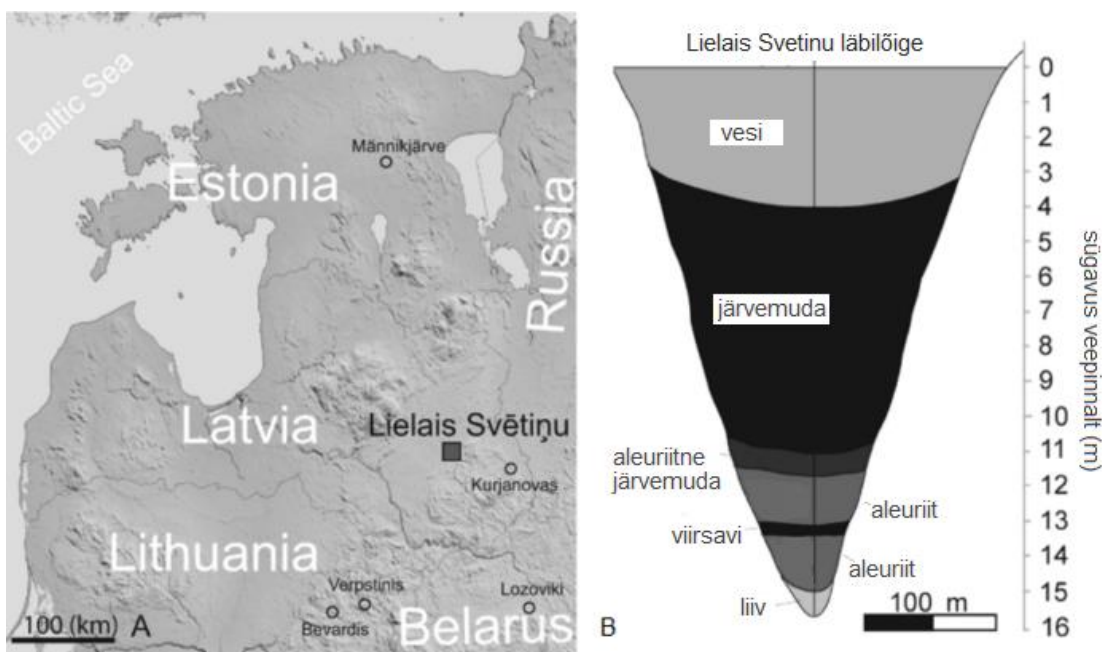
Põhinedes töö eesmärkidel ja kirjanduse ülevaates väljatoodud seisukohtadel, püstitati järgnevad hüpoteesid:

- 1) seenekooslused on ka ajaloolistes järvesetetes, mis pole külmunud, DNA-põhiselt tuvastatavad;
- 2) DNA-põhiselt tuvastatud kooslused annavad detailsema ülevaate seenekooslustest kui klassikalised paleolimnoloogilised meetodid;
- 3) ITS regiooni kasutamine järve põhjasetetest seene koosluse identifitseerimiseks annab täpsema taksonoomilise tulemuse ja mitmekesisuse kui kasutades universaalset 18S rDNA piirkonda.

3 Materjalid ja meetodid

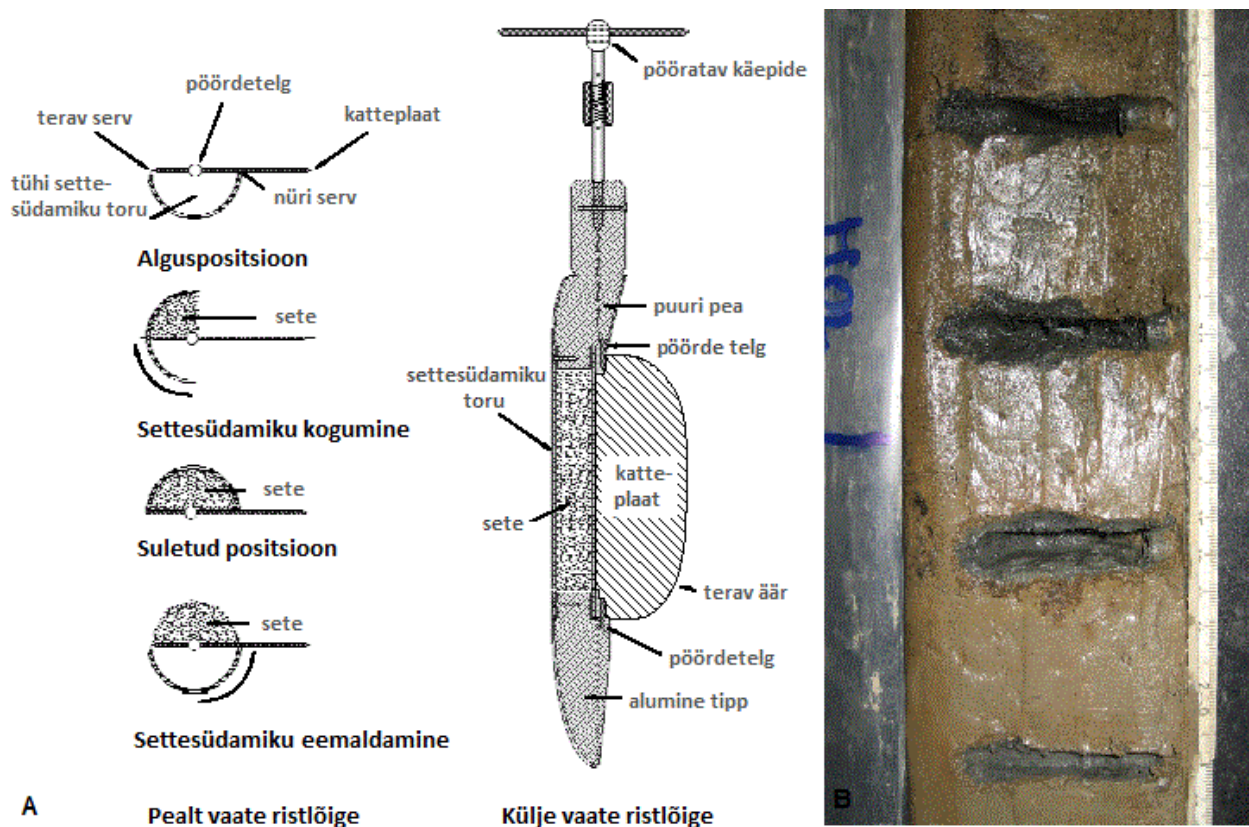
3.1 Proovide kogumine

Proovivõtukohaks oli Läti idaosas asuv Lielais Svetinu järv (Joonis 3). Lielais Svetinu on 18,8 ha suurune, 4 m sügavune, 96,2 m ülalpool meretaset paiknev umbjärv, mis on jäänuk kunagisest suuremast veekogust. Järve valgala (~12 km²) on enamikus kaetud metsaga. Samuti on järve kaldaala ümbritsetud erinevatesse perekondadesse kuuluvate puuliikidega (*Betula*, *Picea*, *Pinus*, *Ulmus*, *Tilia*, *Alnus* ja *Quercus*). Tänapäeval nähtav järve topograafia on kujunenud viimase jäätumise (Weichseli jäätumise) ja sellele järgnenud soojenemisperioodi tulemusena (Stivrins jt., 2014).



Joonis 3. A) Lielais Svetinu asukoht kaardil. B) Lielais Svetinu järve läbilõige (muudetud Stivrins jt., 2014)

Sette puursüdamikud koguti Lielais Svetinu järve keskosast (56°45'N, 27°08') 2013. aasta märtsis Siim Veski ja kolleegide poolt. Selleks kasutati 10 cm diameetriga turbapuuri (Joonis 4). Kokku koguti 11 ühe meetri pikkust vertikaalselt järjestikust sette puursüdamikku. Nii uuriti järve setteid settepinna arvestatuna kuni 11 m sügavuselt. Puursüdamikud pakiti õhukesse kilesse ning seejärel transporditi laborisse proovide kogumiseks ja analüüsiks.



Joonis 4. A) Turbapuuri joonis ja tööpõhimõte (EPA, 1999); B) Proovide kogumine settesüdamiku sügavuskihtidest (antud töö sete, pildistanud Anu Kisand)

Sette puursüdamikest vaadeldi Holotseeni ajavahemikku, mis on Lielas Svetinu puhul ~8 m settesügavust. Kõigist kaheksast puursüdamikust võeti iga 2,5 cm järel setteproov. Eelnevalt kraabiti steriilse spaatliga õhuga kokku puutunud settepind maha. Setteproovid koguti steriilse süstlaga järjestikku puursüdamiku keskosast. Süstlaga võeti igast sügavusest 3 paralleelset 200-400 µl mahuga setteproovi, mis asetati steriilsetesse tuubidesse. Proovid hoiustati -80 °C juures. 320 sügavuskihist valiti välja 54 kihti, kust igast kihist kogutud 3 paralleeli proove kasutati edastistes uuringutes (Lisa 1). Uuringuks valiti välja samal sügavusel paiknevad sügavuskihid, mis Stivrins'i (2014) settepuursüdamiku uuringutes. Valik põhines settimisaegsetel temperatuurimuutustel. Kiiremate temperatuuri muutustega piirkondadest koguti proove tihedamalt (Stivrins jt., 2014).

3.2 Dateerimine

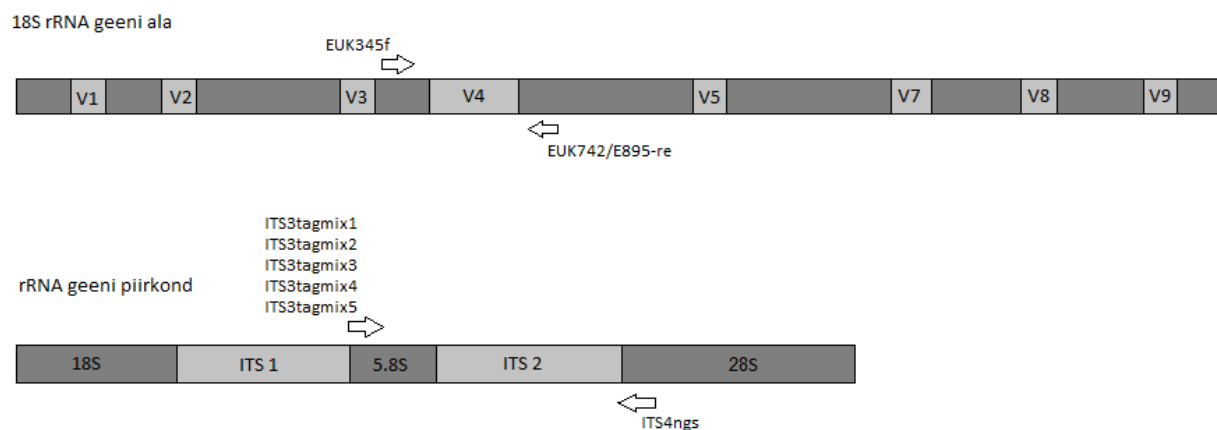
Settepuursüdamike kihtide vanuse määramiseks kasutatakse ^{14}C raadiosüsiniku meetodit. Kuna antud uurimuses kasutati samu settepuursüdamiku sügavuskihte kui Stivrins jt (2014) uurimuses,

siis see võimaldas kasutada ka Stivrinsi poolt arvatatud settekihtide dateeringut. Töös kasutatud settepuursüdamiku settest dateeringuid ei tehtud. Stivrins jt (2014) puursüdamike settekihtidele määrati ^{14}C raadiosüsiniku meetodil 20 dateeringust koosnev ajaskaala, mis kohandati selle uurimuse settekihtidega. Kahe puursüdamiku setted rööbistati sette mineraalse, orgaanilise ja karbonaatse materjali muutuste alusel Tallina Tehnikaülikooli Geoloogia Instituudi töötaja Jüri Vassiljevi poolt. Sellisel viisil leiti 16 rööbistuspunkti, mille puhul oli võimalik tuvastada, et need on mõlemas puursüdamikus sama vanusega. 2009. a kogutud puursüdamiku teadaoleva ajaskaala alusel koostati nii 2013. a kogutud settepuursüdamiku ajaskaala. Saadud ajavahemikele määratud temperatuurid (publitseerimata) saadi Helsingi Ülikooli prof Heikki Seppa käest.

3.3 DNA ekstraheerimine ja PCRi optimeerimine

DNA ekstraheeriti 54 erineva sügavuskihi proovidest 3 kodruses. Kokku eraldati DNA 162 proovist (Lisa 1). DNA ekstraheerimiseks kasutati PowerSoil[®] DNA kitti (Mo Bio Laboratories) ja protokoll. Kiti valik põhines sellel, et PowerSoil[®] DNA eraldus kit on sobilik erinevatest keskkonnaproovidest (sh muda, sete) DNA eraldamiseks. Samuti peaks selle kasutamine eraldama settes leiduvad humiinained ja teised PCRi segavad inhibiitorid (Mo Bio Laboratories koduleht). Setteproovide homogeniseerimiseks kasutati Fast Prep[®]-24 (MP Biomedicals) homogenisaatorit 4m/s juures 55 sekundit. Edasine DNA ekstraheerimine toimus vastavalt PowerSoil[®] DNA eraldus kitis välja toodud tootja poolsele juhendile. Ekstraheeritud proovid säilitati -20°C kuni -80°C juures.

Polümeraasi ahelreaktsioonil (PCR) amplifitseeriti kaks erinevat ribosomaalse DNA piirkonda: ITS2 ala ja 18S rDNA geeni piirkond (Joonis 5). ITS2 lõigu amplifitseerimiseks kasutati seente spetsiifilisi praimereid: ITS3-Mix1-tag, ITS3-Mix2-tag, ITS3-Mix3-tag, ITS3-Mix4-tag, ITS3-Mix5-tag ja ITS4mod-tag (Tabel 1). Peaahela amplifitseerimiseks kasutati kombinatsiooni ITS3-Mix1-tag, ITS3-Mix2-tag, ITS3-Mix3-tag, ITS3-Mix4-tag ja ITS3-Mix5-tag praimeritest ning vastasahela puhul kasutati praimerit ITS4mod-tag. Teise ala, 18S rDNA regiooni, amplifitseerimiseks kasutati universaalseid eukarüootseid praimereid Euk742/895-re ja Euk345f (Tabel 1).

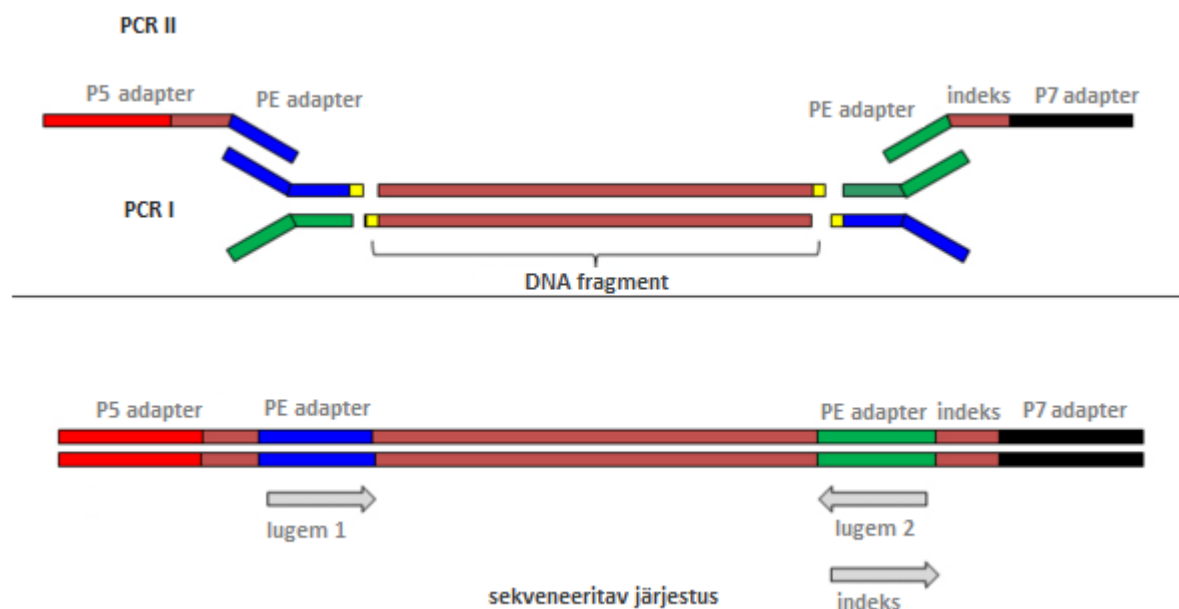


Joonis 5. Ribosomaalne DNA ala koos töös kasutatud praimeritega

Tabel 1. Töös kasutatud praimerid

Praimeri nimi	Järjestus 5' - 3'	Amplifitseeritav piirkond	Allikas
EUK345f	AAGGAAGGCAGCAGGCG	SSU V4	Tedersoo jt, 2015
EUK742/E895-re	AAATCCAAGAATTTACCTCT	SSU V4	Tedersoo jt, 2015
ITS3mix1	CATCGATGAAGAACGCAG	ITS 2	Tedersoo jt., 2014
ITS3mix2	CAACGATGAAGAACGCAG	ITS 2	Tedersoo jt., 2014
ITS3mix3	CACCGATGAAGAACGCAG	ITS 2	Tedersoo jt., 2014
ITS3mix4	CATCGATGAAGAACGTAG	ITS 2	Tedersoo jt., 2014
ITS3mix5	CATCGATGAAGAACGTGG	ITS 2	Tedersoo jt., 2014
ITS4ngs	TTCCTSCGCTTATTGATATGC	ITS 2	Tedersoo jt., 2014

PCRi jaoks kasutati FIMMi (*Institute for Molecular Medicine Finland*) PCR protokoll (Lisa 2), et luua Illumina sekveneerimiseks sobivad ampliconid. Protokoll koosneb kahest etapist. Esimeses PCR reaktsioonis amplifitseeritakse uuritav piirkond (vastavalt ITS2 ja 18S alad) lookuse spetsiifiliste parimeritega, mille küljes on Illumina adapterid (Joonis 6). Teises PCR reaktsioonis lisatakse adapteritele indeksid ja P5/P7 adapterid, mis on vajalikud suure hulga proovide puhul vastavate proovide hilisemaks tuvastamiseks.



Joonis 6. Kaheastmeline PCR adapterite ja indeksite, P5/P7 adapterite lisamiseks (modifitseeritud joonis FIMMi kodulehelt)

PCR reaktsioonisegud segati kokku steriilses keskkonnas (UV kiiritatud laminaaris). PCR I reaktsiooni tingimusi kohandati vastavalt töös kasutatud ITS2 ala praimeritele (Tabel 1). PCRi optimeerimise käigus katsetati erinevaid praimeri seondumistemperatuure (46°C - 52°C), DNA koguseid (1-1,5 μl), praimerite (10 μM) ja BSA (20 mg/ml) kontsentratsiooni muutusi erinevate koguste juures (0,5-1,5 μl) ning DMSO lisamist (0-1 μl). ITS2 ala amplifitseerimiseks sisaldas lõplik PCR reaktsioon (kokku 20 μl): 10 μl Phusion Master Mix HF puhvrit (2x; 1,5 mM MgCl_2) (Thermo Scientific), 1,5 μl mõlemat praimerit (10 μM) (1,5 μl ITS4ngs-tag ja 0,3 μl igat ITS3-Mix1-tag, ITS3-Mix2-tag, ITS3-Mix3-tag, ITS3-Mix4-tag, ITS3-Mix5-tag), 1 μl BSAd (20 mg/ml) (Thermo Scientific), 1-1,5 μl DNAd (olenevalt proovi sügavusest) ja steriilset vett (Molecular Biology Grade Water, Mo Bio Laboratories). ITS2 lõik amplifitseeriti järgmise programmi alusel: esmane denaturatsioon 98°C 30 sek, sellele järgnes 30 tsüklit denaturatsioon 98°C 10 sek, praimerite seondumine 46°C 30 sek, süntees 72°C 15 sek, ja lõpu süntees 72°C 10

min ja lõpptemperatuur 10°C (Master Mix with HF juhend). Universaalsete 18S rDNA praimerite puhul sisaldas PCR reaktsioon (kokku 20 µl) 10 µl Phusion Master Mix HF puhvrit (2x; 1,5 mM MgCl₂) (Thermo Scientific), 1 µl kumbagi praimerit (10 µM), 0,75 µl BSAd (20 mg/ml), 0,1 µl DMSOd (~100%) (Thermo Scientific), 1 µl DNAd ja steriilset vett (Molecular Biology Grade Water, Mo Bio Laboratories). 18S rRNA geeni ala amplifitseeriti järgneva programmi alusel: 98°C 30 sek; 30 tsüklit 98°C 10 sek, 52,5°C 30 sek, 72°C 15 sek; 72°C 10 min ja lõpptemperatuur 10°C (Master Mix with GC Buffer juhend).

Amplikonide olemasolu vaadeldi 1,4% agarosgeelil, mis sisaldas DNA tuvastamiseks 3 µl EtBr. Geeli foreesiti 115 V juures 25 min 1x TAE puhvris (pH 7,4). Proovide visualiseerimiseks ja geelile kandmiseks kasutati 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) segu. Markerina kasutati 2 µl GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) DNA markerit. Proovidele, millel ei olnud UV valguses geelil tuvastatavat PCR produkti, tehti uuesti kolmes korduses PCR I astme reaktsioon. Need kolm PCR I astme produkti segati kokku, puhastati praimerit jääkidest ja kontsentreeriti. Selleks kasutati Select-A-Size DNA Clean and Concentrator™ kitti (Zymo Research, The Epigenetics Company). Select-A-Size DNA Clean and Concentrator kitt võimaldab puhastada PCR produkte praimerite jääkidest, mis on väiksemad kui 300 bp.

PCR II astme reaktsioon (kokku 20 µl), mis oli vajalik Illumina P5/P7 adapterite ja indeksite külge liitmiseks, sisaldas 10 µl Phusion Master Mix HF puhvrit (2x; 1,5 mM MgCl₂) (Thermo Scientific), 0,4 µl Mplex praimerit (25µM), 2 µl long PCR indeksit X (2,5 µM), 1 µl PCR I astme produkti ja vastavalt 6,6 µl steriilset vett (nuclear-free water, Thermo Scientific) (Lisa2). PCR II astmes järgiti FIMMi protokollis välja toodud programmi: 98°C 2 min; 12 tsüklit 98°C 20 sek, 65°C 30 sek, 72°C 30 sek; 72°C 5min ja lõpptemperatuur 10°C. PCR II astme õnnestumist kontrolliti uuesti 1,4% agarosgeelil. Geelil tuvastatud proovid saadeti sekveneerimiseks Soome FIMM sekveneerimiskeskusesse. Sekveneerimine teostati tellimusena Illumina MiSeq Personal Sequencer sekvenaatoriga vastavalt Illumina tootja poolsele protokollile. Andmed saadi *demultiplexitud* kujul st lugemid olid koondatud proovide järgi ühte andmefaili.

3.4 Sekveneerimisandmete töötlus ja analüüs

Sekveneerimisandmete töötlus viidi läbi TÜTI keskkonnamikrobioloogia laboris kasutusel oleva töövoos abil Veljo Kisandi poolt. Toored lugemid filtreeriti Trimmomatic programmi (Trimmomatic ver 0.36; Bolger jt., 2014) abil, et eemaldada adapterid ja muud Illumina

spetsiifilised järjestused ning ebakvaliteetsed nukleotiidid (>Q30). Paarduvad lugemid (2 x 250 bp) joondati kattuvate otse abil üheks pikemaks lugemiks. Sarnased lugemid klasterdati 97% järjestuse sarnasuse alusel OTUdeks (ingl k *operational taxonomic units*) klasterdusprogrammi cd-hit-otu (cd-hit-otu 0.0.1; Li jt, 2012) abil. Igat unikaalset klastrit esindavat järjestust võrreldi andmebaasidega. SILVA andmebaasi (SILVA ver. 115, SILVA andmebaas) kasutati 18S rDNA andmete puhul, kus taksonoomilise kuuluvuse identifitseerimiseks joondati klastrite järjestused SINA aligner (sina_aligner 1.2.11) abil andmebaasi vastu. Lähim sarnane järjestus leiti LCA (ingl k *last common ancestor*) meetodil (Pruesse jt., 2012). UNITE andmebaasi (UNITE ver. 7, UNITE andmebaas) kasutati ITS2 andmete jaoks. Sel juhul blastiti klastrite järjestused BLASTn (blastn 2.2.31+) abil andmebaasi vastu. Seejärel koondati OTUde arvukus ja identiteet ühte koondtabelisse kasutades TÜTI keskkonnamikrobioloogia laboris kirjutatud Phyton'i skripti.

Töödeldud andmete analüüsiks kasutati statistika ja graafikaprogrammi R (R versioon 3.2.4; R Core Team, 2016). Kõik statistilised analüüsid viidi läbi paralleelselt ITS andmestiku, 18S rDNA andmestiku ja 18S andmetest eraldi välja võetud seente andmestikuga. Erinevate andmestike tuvastatud OTUde ja lugemite arvu vaheliste seoste leidmiseks kasutati Pearsoni korrelatsioonikordajat (r) (Wang, 2013). Selleks kasutati R-i funktsiooni *cor()*. Pearsoni korrelatsioonikordaja näitab seost kahe arvulise tunnuse vahel ja võimaldab hinnata tunnuste vahelise seose suunda. Pearsoni korrelatsioon arvutatakse valemist (Rootalu, 2014):

$$r = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{x_i - m_x}{s_x} \cdot \frac{y_i - m_y}{s_y},$$

kus n on proovide arv, x_i tunnuse X väärtus esimeses proovis, y_i tunnuse Y väärtus teises proovis, m_x on X tunnuse keskmine väärtus, m_y on Y tunnuse keskmine väärtus ning s_x ja s_y on vastavate tunnuste standardhälbed. Korrelatsioonikordaja väärtused võivad olla vahemikus 1 kuni -1. Korrelatsioonikordaja 0 näitab, et seos kahe tunnuse vahel puudub. Väärtus, mis on suurem kui 0, näitab positiivset korrelatsiooni ja väärtus, mis on väiksem kui 0, näitab negatiivset seost tunnuste vahel (Rootalu, 2014). Selleks, et hinnata, kas sekveneerimiseks kasutatud sekveneerimissügavus on olnud piisav liigirikkuse tuvastamiseks, arvutati liigirikkuse indeksid Chao1 ja ACE (*Abundance Coverage Estimator*) (O'Hara, 2005). Liigirikkuse hindamiseks kasutatakse kõige enam Chao1 indeksit, mis arvestab haruldaste OTUde arvu proovis. Mida enam on haruldasi OTUsid esineb, seda kõrgem on Chao1 indeks ja seda suurem on tõenäosus, et

tegeliikkuses leidub neis proovides veel tuvastamata OTUsid. ACE indeks aga eeldab, et kõikide liikide esinemine on võrdselt tõenäoline ja lisab veamäärad vastavalt dispersiooni jaotusele. ACE ei arvesta otseselt haruldaste liikide arvuga vaid nende osakaaluga (O'Hara, 2005, Oksanen jt., 2016). Chao1 ja ACE arvutamiseks kasutati R paketi *vegan* funktsiooni *estimateR()*, mis kasutab individuaalsete liikide arvu proovides. Funktsiooni *estimateR()* kasutati seetõttu, et see võimaldab arvutada Chao ja ACE indekseid iga proovi kohta eraldi (Oksanen, 2016). Bioloogiliste paralleelide vahelise erinevuste ja teiste võimalike mõjutegurite testimiseks kasutati Nonlinear Mixed-Effects mudelit (Fox ja Weisberg, 2015). Nonlinear Mixed-Effects mudel võimaldab hinnata erinevate üksteisest sõltuvate gruppide mõjusid (Fox ja Weisberg, 2015). Bioloogiliste paralleelide vahelise erinevuse hindamiseks kasutati Ri paketti *nlme* (Bates, 2011; Fox ja Weisberg, 2015). Kuid selleks, et näha, milliste bioloogiliste rühmade vahel vastavad seosed esinevad, rakendati lisaks Ri funktsioon *TukeyHSD()*. TukeyHSD (ingl k *Tukey's Honest Significance Test*) on nn *post-hoc* protseduur, mis võimaldab vaadelda kõiki gruppe ja nende koosmõjusid juba rakendatud analüüsile (Barros, 2013). Lisaks bioloogiliste paralleelide vahelistele erinevustele taheti näha, kas teistel teguritel (PCRi kontsentreerimine ja puhastamine, PCRii 2,5 µM indeksi kasutamine ja setteproovide sügavus) esineb mingisugune mõju OTUde arvule. Selleks kasutati samuti Nonlinear Mixed-Effects mudelit Ri paketi *nlme* (Bates, 2011; Fox ja Weisberg, 2015).

ITS ja 18S andmestike liigirikkus (unikaalsed OTUd) visualiseeriti interaktiivse veebi lehitseja põhise visualiseerijaga Krona (Ondav jt., 2011). Krona on tööriist, mis lubab läbi interaktiivsete graafiku detailide uurida klassifikatsiooni keerukat hierarhiat (Ondav jt., 2011). Lisaks eelnevalt arvutatud liigirikkuse indeksile Chao1 sooviti vaadelda ka proovides esinevat liikide mitmekesisust. Andmestike mitmekesisuse hindamiseks kasutati Shannon-Weaver indeksit (H') (Shannon ja Weaver, 1964), mis arvutati R paketi *vegan* funktsiooni *diversity()* abil (Oksanen, 2016). Shannon-Weaver indeks (H') arvestab liikide arvukuste erinevusi. Liikide mitmekesisus arvutatakse valemist (Oksanen, 2016):

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i ,$$

kus p_i on liigi proportsioon ja S liikide arv. P_i (liigi proportsioon) leitakse liigi lugemite arvu jagamisel kogu proovis esinevate lugemite arvuga. P_i korrutatakse naturaallogaritmiga p_i ja iga

liigi kohta saadud ($p_i \times \ln p_i$)-d liidetakse omavahel. Nii saadakse Shannon-Weaveri indeks iga proovi kohta eraldi. Mida suurem on H' seda suurem on liikide mitmekesisus proovis. Samas kuna indeks kasutab liikide proportsioone, siis proportsioonilt domineerivad liigid langetavad indeksi väärtust. Lisaks sooviti näha, kui ühtlaselt on liikide mitmekesisus jaotunud vaadeldud proovides. Selleks arvutati Shannon'i tasakaalu indeks (E_H), mis näitab, kui ühtlaselt on liigiline mitmekesisus vaadeldavas proovis jaotunud. Tasakaaluindeks arvutatakse Pielou's J valemi alusel (Heip jt., 1998):

$$J = H' / H_{\max} ,$$

kus H' on liikide mitmekesisus ja H_{\max} on maksimaalne H' väärtus kui kõiki liike oleks proovis võrselt. $E_H (J)$ väärtus jääb vahemikku 0-1. Mida väiksem on $E_H (J)$ väärtus, seda ühtlasemalt on liigid jaotunud vaadeldavas proovis. Tasakaaluindeks arvutati R pakett *BiodiversityR* funktsiooni *diversityresult()* abil (Kindt, 2016).

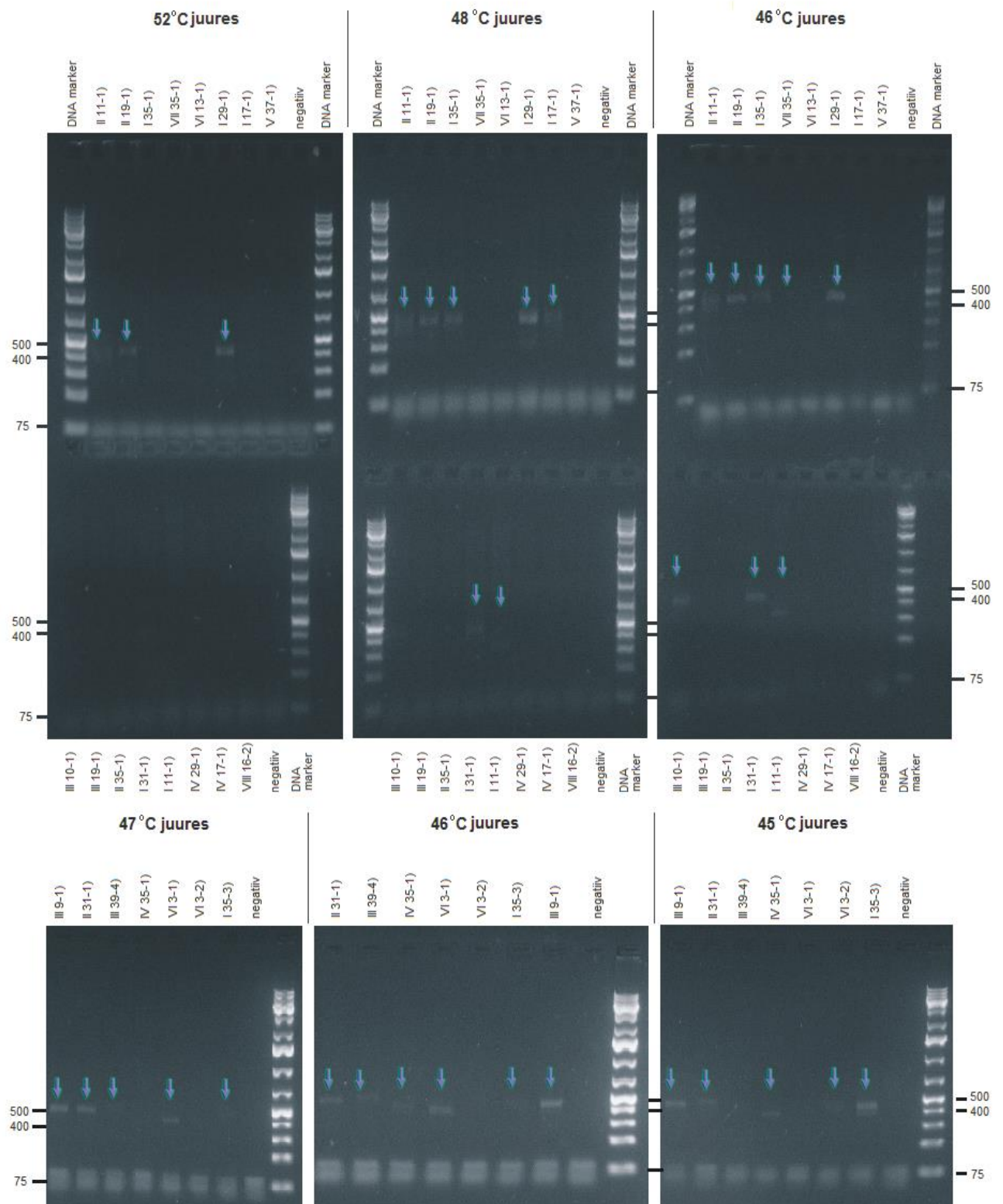
Kõigi töös esitatud jooniste (v.a Krona) tegemiseks kasutati R paketti *ggplot2*. Hõimkondade tasemel OTUde mitmekesisuse muutuste hindamiseks loodi sügavusgraafik, kus ühes sügavuskihist kogutud proovide OTUd paigutati samale joonele. Kõigile sügavuskihtidel piiritleti suurim ja väikseim OTUde arv ning arvutati keskmine OTUde arv sügavuskihis. Selleks kasutati *Ri stat_summary* (*fun.y = mean, fun.ymin = min, fun.ymax = max*) käsklust. Sügavuskihid seostati vastavate ajaperioodidega. Seente elukeskkonna ja rolli määramiseks kasutati ID numbri alusel manuaalset NCBI otsingut ja määratlemist. Samuti kasutati Leho Tedersoo käest saadud seente troofsuse ja eluviisi põhise andmebaasi. Patogeensete perekondade määramiseks kasutati Stefano Ghighone'lt (DPSP andmebaasi tegijatelt) saadud patogeenide andmebaasi. Mõlemast andmestikust (ITS ja 18S andmestik) määrati elukeskkond ja roll vähemalt neljas proovis esinenud OTUdele.

4. Tulemused

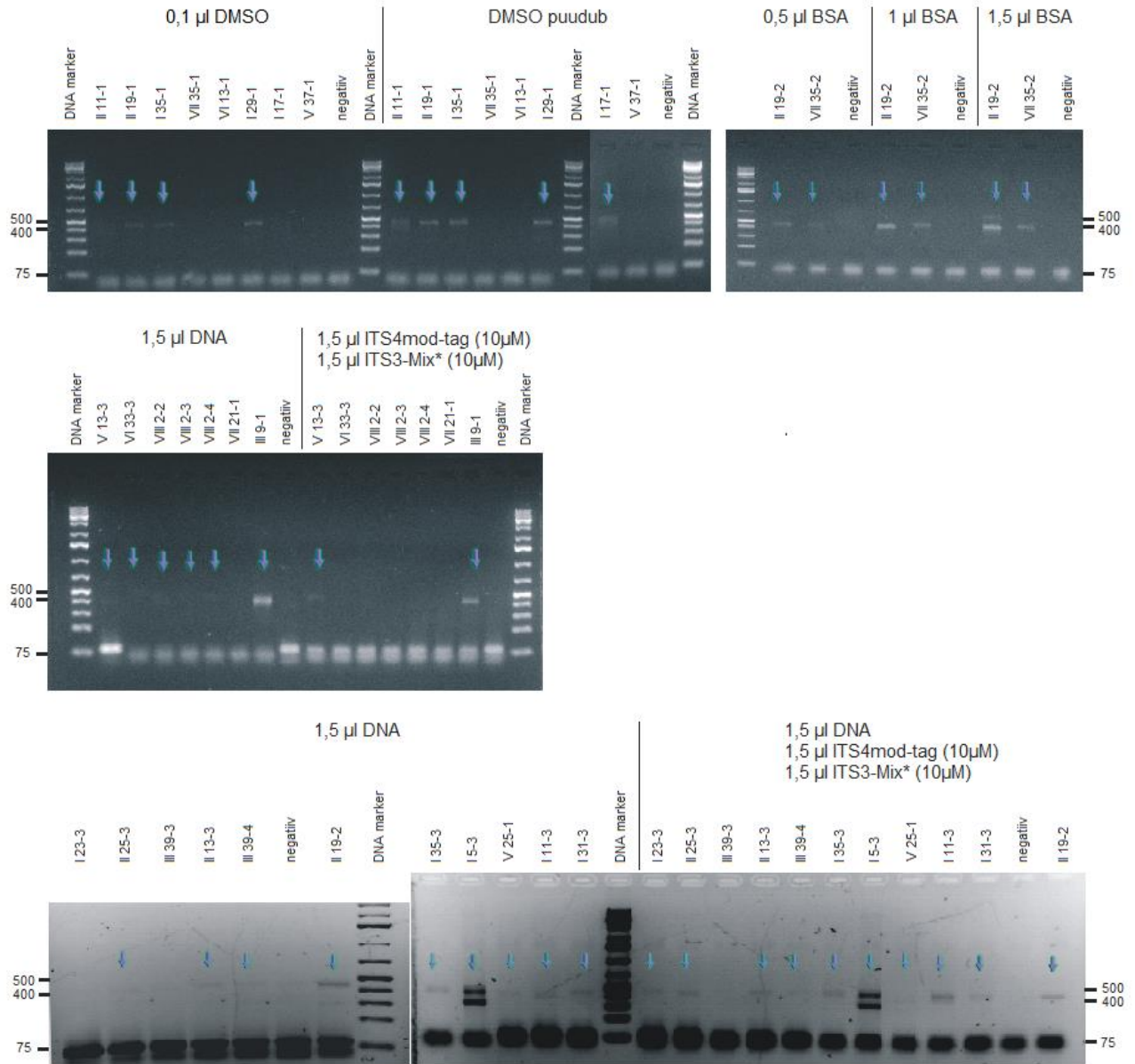
4.1 PCRi optimeerimine

Parima amplifitseerimistulemuse saavutamiseks katsetati PCR I astme optimeerimisel erinevaid praimeride seondumistemperatuure (46°C - 52°C), DNA koguse ($1\text{--}1,5\ \mu\text{l}$), praimerite ja BSA kontsentratsiooni muutusi (vastavalt $0,5\text{--}0,75\ \mu\text{M}$ ja $0,5\text{--}1,5\ \text{mg/ml}$) ning DMSO lisamist ($0\text{--}1\ \mu\text{l}$) (Joonis 7; Joonis 8; Joonis 9). Esmalt järgiti FIMMI protokoll ja *Phusion Master Mix with HF buffer* juhendis välja toodud soovitusi ning püüti leida sobivat praimeride seondumistemperatuuri. Joonisel 7 on näha erinevate praimeride seondumistemperatuuride juures teostatud PCR I astme amplifikatsiooni tulemused agarose geelil. ITS2 piirkonna ampliconid on nähtavad DNA markeri vahemikus $400\text{--}500\ \text{bp}$. Kõige parema amplifitseerimistulemuse andis ITS2 ala praimerite seondumine PCR I astme reaktsioonis 46°C juures (Joonis 7). 46°C juures seondumisel amplifitseeriti ITS2 ala üles rohkemates proovides kui teiste seondumistemperatuuride juures. Ülejäänud reaktsiooni temperatuurid vastasid *Phusion Master Mix with HF buffer* juhendis soovitatule.

Järgnevalt muudeti FIMMi protokollis (Lisa 2) välja toodud PCR I astme reaktsioonisegu komponentide koguseid. Kuna DMSO aitab PCR reaktsioonis DNAd denatureerida, siis prooviti DMSO lisamist PCR I astme reaktsiooni segule (Joonis 8). Jooniselt 8 on näha, et DMSO lisamine lõppkontsentratsioonil $0,5\%$ ei parandanud amplifikatsiooni. Seetõttu DMSO lisamisest reaktsioonisegule loobuti. Testiti ka erinevaid BSA koguseid, kuna BSA parandab DNA polümeraasi stabiilsust. Läbi DNA polümeraasi stabiliseerimise on võimalik tõsta amplifitseerimise efektiivsust. Joonisel 8 on näha PCR I produktid geelil erinevate BSA kontsentratsioonide juures. Kõige parema amplifikatsiooni andis BSA lisamine lõppkontsentratsioonil $1,5\ \text{mg/ml}$, mis oli väga sarnane juhul, kui kasutati lõppkontsentratsiooni $1\ \text{mg/ml}$ (Joonis 8). Sarnase amplifikatsiooni efektiivsuse tõttu kasutati edaspidiselt reaktsioonisegus $1\ \text{mg/ml}$ BSAd. Järgnevalt testiti praimerite ja DNA kontsentratsiooni suurendamist. Sellega loodeti parandada amplifikatsiooni pigem sügavamatest settekihi proovidest. Jooniselt 8 on näha, et üksnes praimeride koguse suurendamine ei andnud head efekti, samas kui DNA hulga tõstmisega paranes amplifikatsiooni saagis. Parima tulemuse andis aga DNA ja praimerite koguse koos suurendamine (Joonis 8).



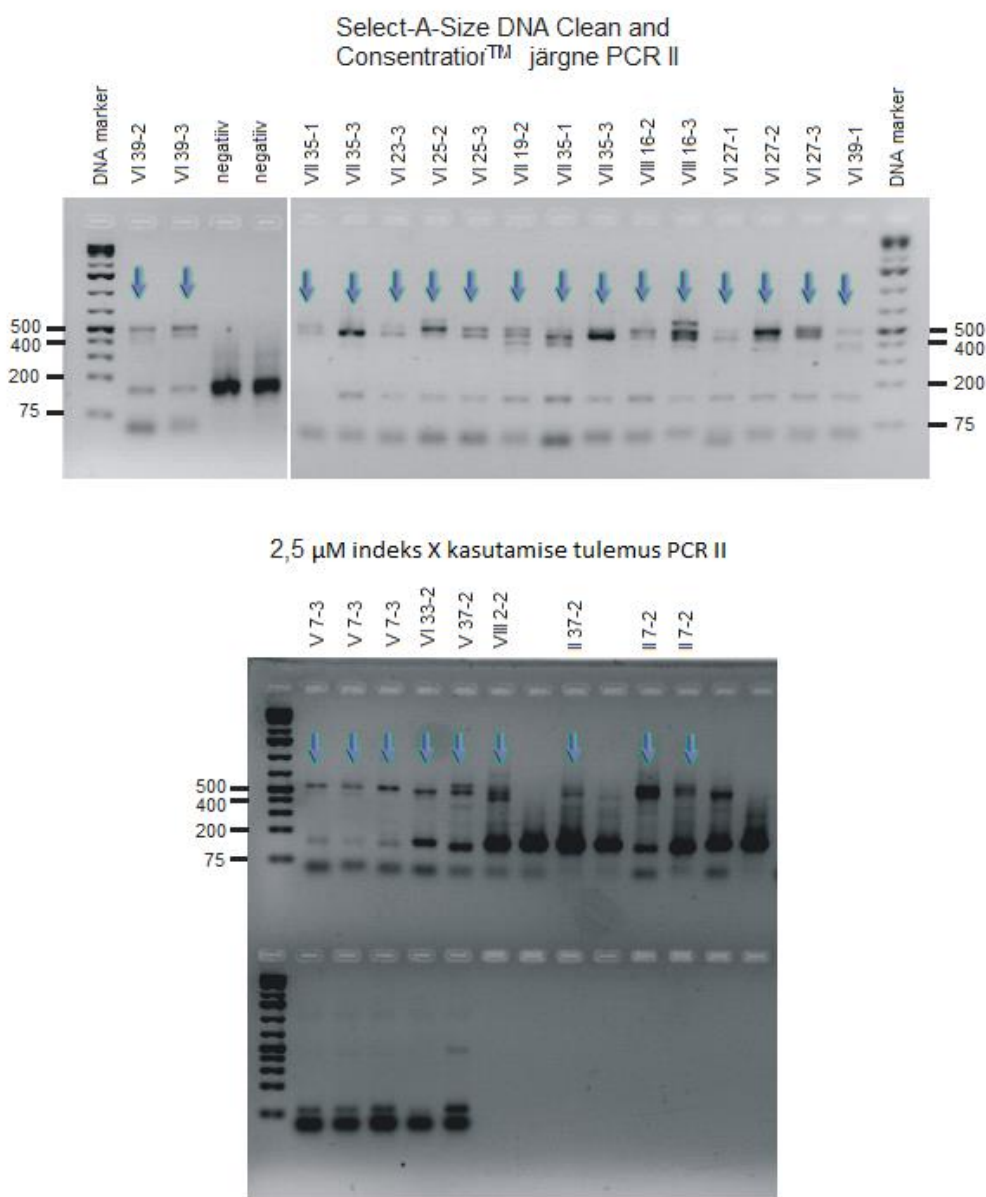
Joonis 7. Praimeri erinevate seondumistemperatuuride juures teostatud PCR I astme reaktsiooni produktid 1,4% agarosgeelil. ITS2 amplikonid on nähtavad DNA markeri vahemikus 400-500 aluspaari.



Joonis 8. PCR I reaktsioonisegu komponentide konsentratsioonide muutused geelil.

Ebaõnnestunud PCR I astme produktidega proovidele teostati uued 3 korduses PCR I reaktsioonid, mis puhastati Select-A-Size DNA Clean and Concentrator™ kitiga. Joonisel 9 on näha kontsentreerimisele ja praimerijääkide puhastamisele järgnenud PCR II astme produktid geelil. PCR I astme järgne praimerijääkidest puhastamine ja PCR I astme produkti kontsentreeritus võimaldas edukat amplifikatsiooni PCR II astme reaktsioonis. PCR II astme reaktsiooni puhul eksperimenteeriti “long PCR” primer indekse 2x lahjema konsentratsiooniga.

2,5 μ M indeksi kasutamine andis edukaid tulemusi proovidele, mille PCR II aste oli ebaõnnestunud indeksi kontsentratsioonil 5 μ M (Joonis 9). Joonisel 9 pole välja toodud negatiivset kontrolli, kuna PCR II astme reaktsioonis kinnituvad “long PCR” praimerid vaid Illumina adaptoreid omavatele järjestustele, seetõttu välise saaste oht puudub. Seda kontrolliti eelnevalt ka katseliselt ja seetõttu pole siinkohal PCR II astme puhul negatiivseid kontrolle välja toodud. PCR optimeerimise tulemusel loodi uus PCR protokoll algse FIMM protokoll aluseks võttes (Lisa 3).



Joonis 9. PCR II astme produktid peale PCR I astme produktide konsentreerimist ja puhastust ning lahjendatud indeksi kasutamisel.

4.2 Sekvenerimistulemuste kvaliteet

Illumina MiSeq (2x250 bp) 8 sekvenerimisanalüüsi tulemusel saadi kokku ~111 miljonit lugemit. ITS2 ala kohta 60,6 miljonit lugemit ja 18S rDNA ala korral 50,3 miljonit lugemit. Pärast lugemite töötlust Trimmomatic programmiga, mille käigus eemaldati Illumina adapterid ja ebakvaliteetsed järjestused, jäi järele ITS2 piirkonna lugemeid 47 miljonit ja 18S rDNA ala lugemeid 41 miljonit. Järjestused klasterdati kokku 97% järjestuse sarnasuse alusel, mille tulemusel saadi 15 820 klastrit ITS2 ala kohta ja 23 878 klastrit 18S rDNA järjestuste puhul. Andmebaaside vastu blastimisel suudeti tuvastada ITS2 klastrite taksonoomiline kuuluvus kuni liigi tasemeni ja 18S rDNA klastrite puhul kuni perekonna tasemeni. Kui BLASTn hit jäi alla 80%, siis identifitseeriti see kui tuvastamatu grupp. Taksonoomilist vastet mitte andnud klastrid eemaldati edasisest analüüsist. 18S rDNA ala taksonoomiliselt tuvastatud OTUdest eemaldati mitte eukarüootide hulka kuuluvad OTUd. ITS2 ala abil taksonoomiliselt tuvastatud OTUdest eemaldati mitte seente hulka kuuluvad OTUd. Lõplik ITS2 andmekogum sisaldas kõikide proovide peale kokku 4469 OTUt (767 unikaalset OTUt) ja 11 046 895 lugemit ning 18S rDNA andmekogum 4028 OTUt (1054 unikaalset OTUt) ja 6 854 765 lugemit.

ITS2 ala praimeritega amplifitseeritud ja sekveneeritud proovidest saadi kokku sarnane suurusjärg OTUsid kui universaalse 18S rDNA praimeritega. ITS2 andmekogum sisaldas proovides kokku 441 OTUt enam kui 18S rDNA andmestik (Lisa 4, Tabel 4). Universaalset 18S rDNA ala praimerit kasutades suudeti tuvastada kõigisse suurematesse riikidesse kuuluvaid eukarüoote (*Archeplastia*, *Fungi*, *Metazoa*, *Protozoa*) (Lydolph jt., 2005; Baldauf, 2008) (Lisa 4, Tabel 1). 18S rDNA andmetest moodustasid seened 21% (kokku proovides 847 OTUt). ITS2 piirkonda kasutades saadi 5,3 korda enam seente OTUsid kui 18S rDNA ala puhul. 50 enim proovides esinenud OTUt esindasid ITS2 puhul 67% ja 18S rDNA andmestiku puhul 63% lugemitest. Proovides esinenud lugemite arvu ja tuvastatud OTUde arvu vahel esines ITS2 andmestikus tugevam seos ($r=0,57$; $p<0,001$) kui 18S rDNA andmestiku puhul ($r=0,4$; $p<0,001$) (Lisa 5). 18S rDNA andmestikus olevate seente OTUde ja lugemite arvu vahel proovides ei esinenud seost ($r=0,056$; $p=0,45$) (Lisa 5). Samas oli sekvenerimissügavus piisav, et hinnata uuritavate proovide koosluse liigirikkust. Chao 1 ja ACE indeks proovides oli võrdne OTUde arvuga proovis (Lisa 6). Lisas 6 on näha ka võimalikud Chao 1 indeksi veamäärad (se.Chao1 ja se.ACE).

Samuti vaadeldi igast sügavuskihist võetud 3 bioloogiliste paralleelide vahelist sarnasust. Selleks hinnati nii proovides sisalduvate OTUde üldarvu kui ka Shannoni indekseid sõltuvust bioloogiliste paralleelide vahel. 18S rDNA andmete bioloogilised paralleelid ei olnud üksteisest statistiliselt oluliselt erinevad ($p=0,95$) (Lisa 7). Samas aga 18S rDNA seente andmete bioloogilised paralleelid olid tunduvalt erinevad ($p=0,006$). Erinevus tuleneb esimese paralleeli erinevusest teise ja kolmanda paralleeli suhtes ($p=0,057$ ja $p=0,0069$) (Tabel 2). Lisas 7 on näha, et ITS2 ala bioloogilised paralleelid on oluliselt erinevad ($p<0,001$). TukeyHSD näitab, et erinevus on tingitud sarnaselt 18S rDNA seente andmetele esimese paralleeli erinevusest teise ja kolmanda suhtes ($p=0,015$ ja $p<0,001$) (Tabel 2). Nonlinear Mixed-Effects Model'it kasutades hinnati erinevate tegurite (sügavus, optimeerimise meetodid, bioloogiline paralleel) koosmõju OTUde arvule või Shannoni indeksele. Lisas 7 on näha, et sügavus ei ole statistiliselt oluline üheski andmestikus mudel 2 puhul, kus on arvestatud Shannoni indekseid. Samas aga mudel 1 puhul, mis arvestab OTUde arve proovides, on näha sügavuse mõju 18S ja ITS2 andmestikes. Samuti on ITS2 andmetes näha, et PCR optimeerimisel kasutatud erinevad meetodid (PCR I astme kontsentreerimine ja puhastamine, PCR II astmes lahjendatud indeksi kasutamine) ei olnud statistiliselt olulised kummaski mudelis ($p=0,15$; $p=0,06$) (Lisa 7).

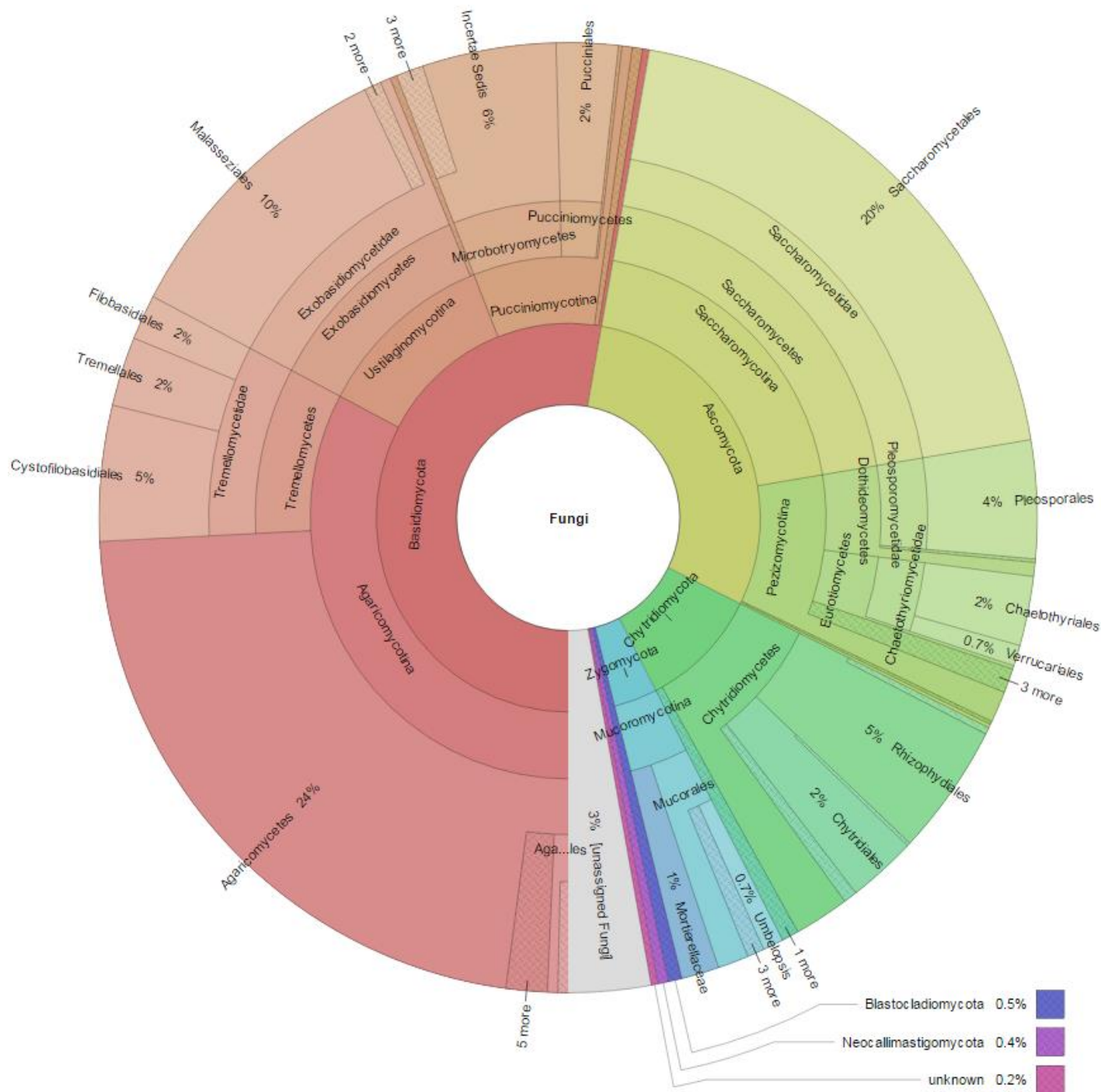
Tabel 2. TukeyHSD analüüs bioloogiliste paralleelide vahel

18S rDNA seente andmed					ITS andmed				
Tukey multiple comparisons of means									
95% family-wise confidence level									
shannon_index ~ factor(Bioloogiline_paralleel)									
\$`factor(Bioloogiline_paralleel)`									
diff					diff				
lwr					lwr				
upr					upr				
p adj					p adj				
2-1	-0.314	-0.636	0.008	0.057	2-1	-0.321	-0.592	-0.051	0.015
3-1	-0.416	-0.736	-0.095	0.006	3-1	-0.612	-0.885	-0.340	0.000
3-2	-0.102	-0.447	0.243	0.765	3-2	-0.291	-0.560	-0.021	0.030

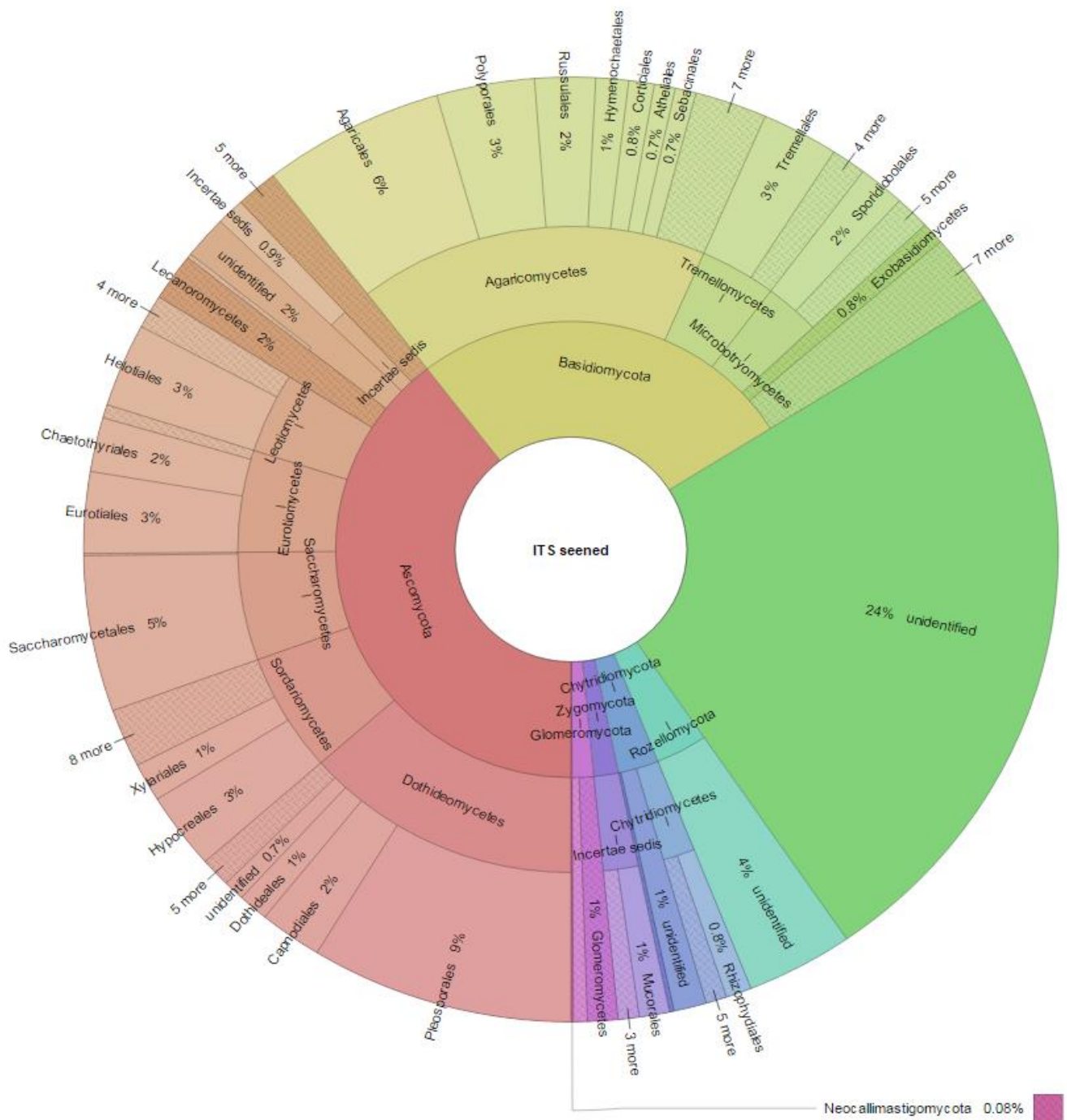
4.3 Liigirikkus ja mitmekesisus

Erinevate andmestike OTUde taksonoomiline jaotuvus on näidatud interaktiivsetel graafikutel (Lisa 8; Joonis 10; Joonis 11). Graafikutel on taksonoomilised grupid jaotatud vastavalt SILVA või UNITE andmebaasi taksonoomilisele hierarhiale. 18S rDNA või ITS2 andmestiku põhjal koostatud graafikuid saab vaadelda interaktiivselt tööle lisatud html failidest. 18S rDNA ala abil suudeti kirjeldada 108 perekonda, millest 87,9% kuulusid suurtesse klaadidesse *Holozoa*, *Archaeplastida*, *Stramenopiles* ja *Alveolata*. Lisas 8 on näha, et *Archaeplastida* jagunes maismaataimedeks (*Embryophyta*) ja rohevetikateks (*Chlorophyta*). Maismaataimed kuulusid kolme põhilisse hõimkonda *Bryophyta* (lehtsammaltaimed), *Coniferophyta* (okaspuud) ja *Magnoliophyta* (õistaimed). Väga liigirikas oli *Chlorophyta* grupp, kuhu kuulus 18 perekonda rohevetikaid. *Holozoa* gruppi kuuluvast riigist *Metazoa* tuvastati perekonna tasemel vaid *Sphaeroeca*, mis kuulub tsüanoflagellaatide (*Choanomonada*) klaadi. Kokku tuvastati *Metazoa* grupist 7 hõimkonda ja 9 klassi (*Arachnida*, *Branchiopoda*, *Maxillopoda*, *Insecta*, *Mammalia*, *Teleostei*, *Bivalvia*, *Gastropoda*, *Turbellaria*). *Holozoa* grupist enamiku moodustasid riiki *Fungi* kuuluvad organismid (Lisa 8).

18S rDNA ala järjestuse abil suudeti kirjeldada kokku 29 erinevat seente perekonda, millest enamik kuulusid hõimkondadesse *Basidiomycota* (41,3%) ja *Ascomycota* (37,9%) (Joonis 10). Hõimkonda *Basidiomycota* kuulus 8 seente klassi, milles liigirikkaim oli klass *Agaricomycetes* (5 perekonda), ja hõimkonda *Ascomycota* 7 seente klassi, millest liigirikkam 10 perekonnaga *Saccharomycetes*. Kokku kirjeldati 6 erinevat seente hõimkonda. Tabelist 2 (Lisa 4) on näha, et 18S rDNA seente andmetes esines üks sugukond (*Blastocladiomycota*), mida ITS2 ala puhul ei tuvastatud. ITS2 ala abil suudeti tuvastada seeni ka liigi tasemel. Kokku kirjeldati 529 erinevat liiki, mis kuulusid 343 perekonda. Perekondadest 53,9% kuulusid hõimkonda *Ascomycota* ja 40,5% hõimkonda *Basidiomycota*. Kokku tuvastati 7 seente hõimkonda, milles sugukonnad *Glomeromycota* ja *Rozellomycota* ei esinenud 18S rDNA seente andmestikus. Hõimkonda *Ascomycota* kuulus 11 erinevat seente klassi ja hõimkonda *Basidiomycota* 9 seente klassi. Kõige liigirikkamad olid hõimkonda *Ascomycota* kuuluvad klassid *Dothideomycetes* (53 liiki), *Sordariomycetes* (50 liiki), *Saccharomycetes* (49), *Eurotiomycetes* (47 liiki) ja hõimkonda *Basidiomycota* kuuluvad klassid *Agaricomycetes* (147 liiki) ja *Tremellomycetes* (31 liiki) (Joonis 12). ITS2 ja 18S rDNA järjestuse alusel tuvastatud seente klassidest kattus *Basidiomycota* hõimkonna tasemel 82,3% ja *Ascomycota* tasemel 77,7%.



Joonis 10. 18S rDNA ala abil kirjeldatud seente liigrikkus. Graafikul on näha suuremad grupid ja nende taksonoomiline kuuluvus kuni seltsi tasemeni. Interaktiivselt saab graafikut uurda tööle lisatud failidest.



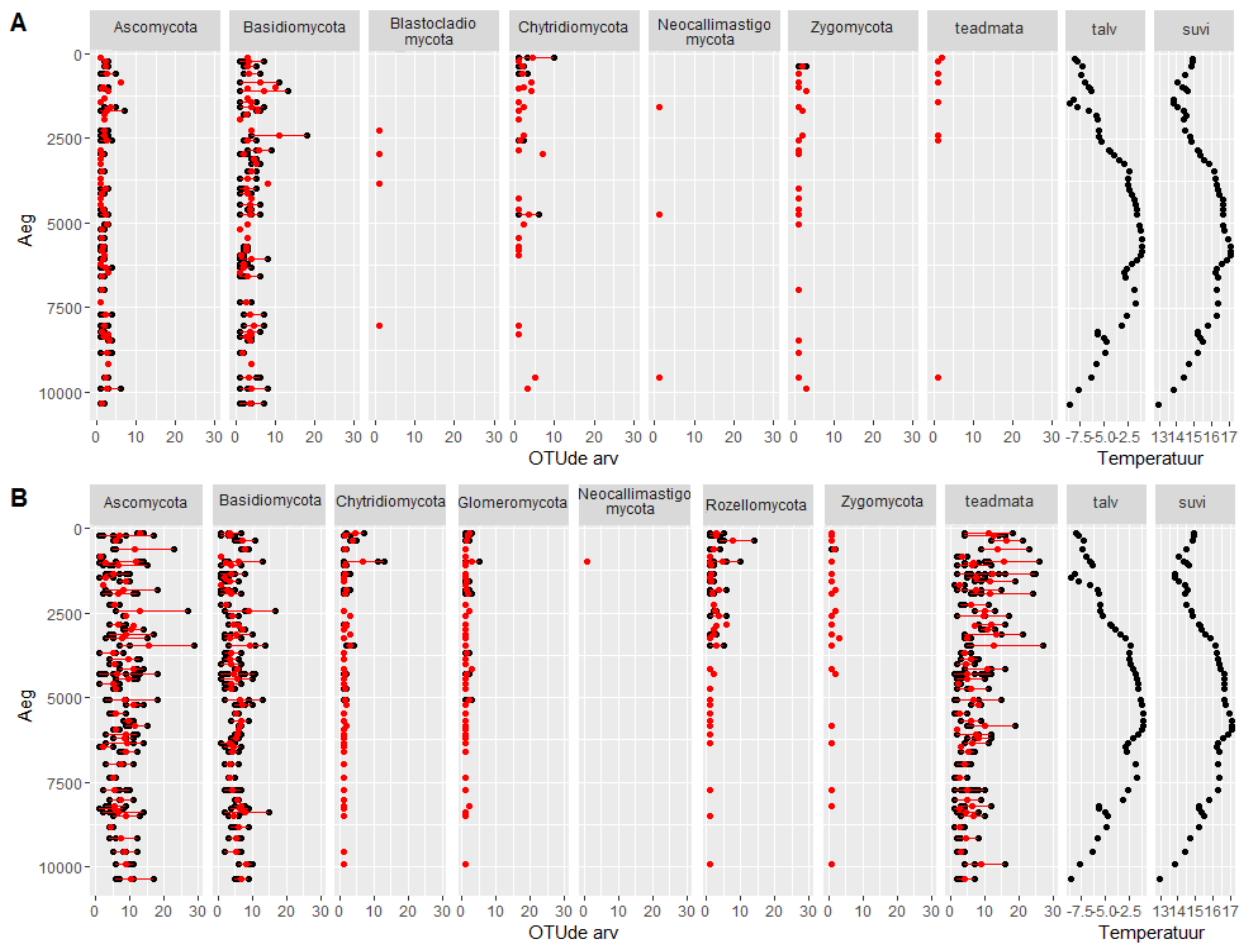
Joonis 11. ITS2 ala abil kirjeldatud seente liigrikkus. Graafikul on näha suuremad grupid ja nende nende taksonoomiline kuuluvus kuni seltsi tasemeni. Interaktiivselt saab graafikut uurda tööle lisatud failidest.

Liigilist mitmekesisust vaadeldi proovides esinenud OTUde arvu ja Shannon-Weaver indeksi alusel. Mitmekesisuse jaotuvust koosluses hinnati tasakaalu (*Eveness*) indeksi abil (Lisa 9). Lisa 8 on välja toodud OTUde arvu, Shannon-Weaveri ja tasakaalu indeksite muutused erinevates

proovides. Kõige suurem mitmekesisus tuvastati ITS2 andmestikust ja kõige väiksem 18S rDNA seente andmestikust. Kõige enam OTUsid esines ITS2 andmestikus (ligikaudu 30 OTUt proovis), kus Shannoni indeks oli keskmiselt 2-3. Samas aga 18S rDNA seente andmestiku enamikes proovides jäi OTUde arv alla 10 ja Shannon-Weaveri indeks keskmiselt 1,3. 18S rDNA andmestiku OTUde arv proovides jäi üldiselt alla 30 ja Shannon-Weaveri indeks oli keskmiselt 2. Lisas 9 on ka näha, et suurema Shannoni indeksi (suurema mitmekesisuse) korral on üldiselt suurem ka tasakaalu indeksi väärtus. See näitab, et suure tasakaalu indeksi väärtuse puhul on koosluse varieeruvus väike ja tuvastatud liigid esinevad küllaltki võrdselt. Tasakaalu indeks oli kõikidel andmestikel keskmiselt vahemikus 0,5-0,6 (Lisa 9). Pearsoni korrelatsiooni kasutati, et võrrelda OTUde arvu ja Shannoni indeksite ning Shannoni ja tasakaalu indeksite vahelisi seoseid erineva sügavusega proovides. Kõige sarnasemad muutused OTUde arvu ja Shannoni indeksite vahel erinevates proovides esinesid 18S rDNA seente andmestikus ($r=0,8$). Suhteliselt tugev korrelatsioon esines ka 18S rDNA kogu andmestikus ($r=0,47$). Seevastu ITS2 andmestikus oli OTUde arvu ja Shannoni indeksite vaheline seos suhteliselt väike ($r=0,27$). See tuleneb asjaolust, et mitmekesisus on erinevates proovides varieeruv. Samas on ITS2 andmestikust näha, et 23.-36. proovi juures on OTUde arv ühtlaselt madal, kuid mitmekesisus kõrgem (Lisa 9). Shannoni ja Evenessi indeksite vahelised seosed olid kõigil andmestikel tugevad ($r_{18S \text{ andmestik}}=0,67$; $r_{18S \text{ seened}}=0,85$; $r_{ITS \text{ andmestik}}=0,78$). Lisas 9 on ka näha, et suurema mitmekesisuse puhul on üldiselt ka nende jaotumine koosluses ühtlasem. Samuti on näha, et väga väikese Shannoni indeksi puhul on ka tasakaaluindeksi väärtus praktiliselt null. See näitab, et väikse mitmekesisusega proovides on tuvastatud OTUd ebaühtlastelt jaotunud ja domineerivad väike hulk (1-2) OTUsid.

Seente hõimkondade OTUde mitmekesisust ja muutusi erinevatel sügavustel saab vaadelda sügavusgraafikult (Joonis 12). Jooniselt 12 on näha, et mõlema andmestiku puhul olid kõige mitmekesisemad suured hõimkonnad *Ascomycota* ja *Basidiomycota*. 18S rDNA seente andmestikus oli kõige mitmekesisem hõimkond *Basidiomycota* ja ITS2 andmestikus *Ascomycota*. ITS2 andmestiku puhul on näha väikest trendi mitmekesisuse vähenemisel sügavuse kasvades. ITS2 fragmendi abil on suudetud suhteliselt hästi tuvastada mitmekesisust erinevatel sügavustel ka teistes joonisel välja toodud hõimkondades, v.a. *Neocallimastigomycota*. *Neocallimastigomycota* hõimkonda kuuluvaid seeni suudeti tuvastada vaid ühest sügavuskihist. Samas on ITS2 fragmendi kasutamisel saadud palju veel taksonoomiliselt tuvastamatuid OTUsid. 18S rDNA järjestuse abil on suudetud tuvastada ka hõimkondadesse *Ascomycota*, *Chytridiomycota* ja *Zygomycota* kuuluvaid seeni. Samas aga hõimkondadesse

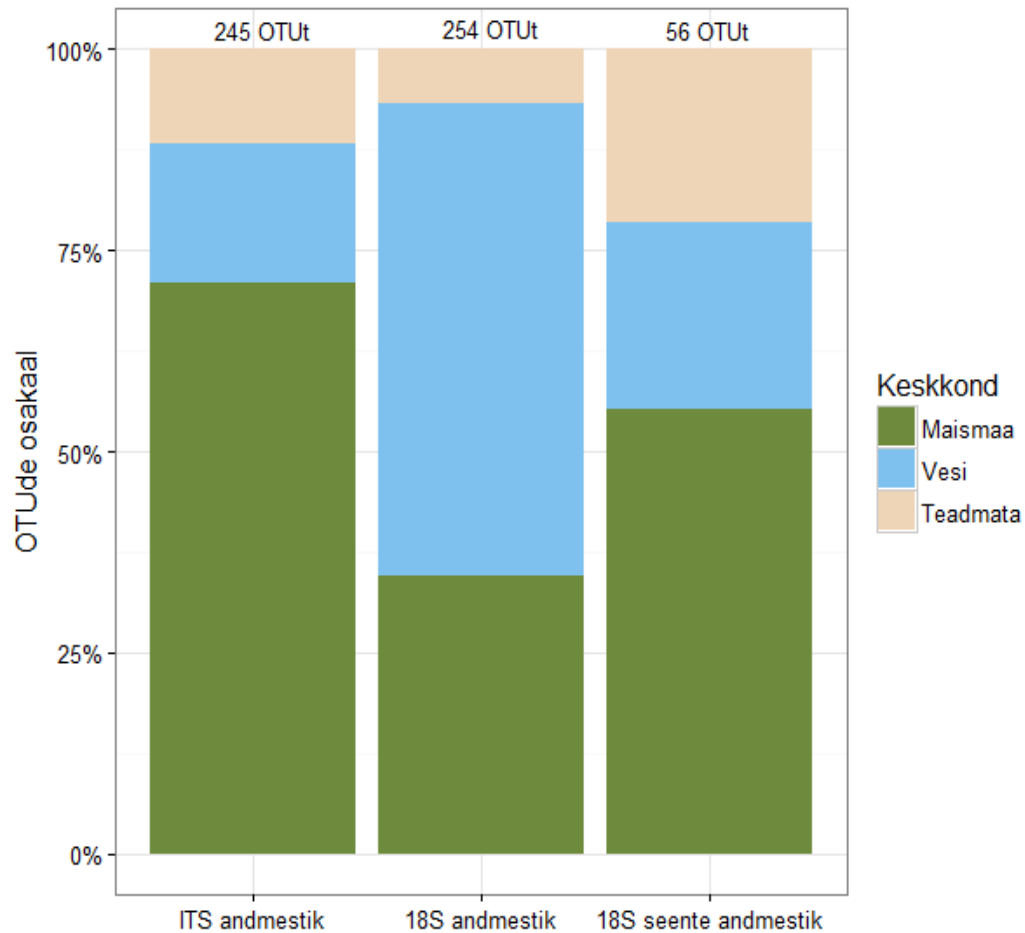
Neocallimastigomycota ja *Blastocladiomycota* kuuluvate seente tuvastamine on olnud kehv. Mõlemate andmestike puhul on hõimkondadesse *Ascomycota* ja *Basidiomycota* kuuluvate seente mitmekesisuse muutused erinevatel sügavustel üldiselt sarnased. Seente mitmekesisuse muutusi erinevate sügavustel seostati ka vastavate temperatuurimuutustega. Otsest seost ei leitud, kuid ITS2 andmestikus on jooniselt 12 näha, et suuremate temperatuurimuutustega perioodidel on seente mitmekesisuse muutused olnud suuremad. ITS2 andmestikust on näha *Ascomycota* ja *Basidiomycota* hõimkondade puhul, et ajavahemikul 1250-2500 aastat tagasi seente mitmekesisus langeb. Samal ajavahemikul on näha ka suurem temperatuurilangusega periood. Sarnaseid muutusi seente mitmekesise muutustes on näha ka ajavahemikel 5000-8500 ja 8750-10 000 aastat tagasi (Joonis 12).



Joonis 12. Hõimkondadesse kuuluvate seente mitmekesisus erinevatel sügavustel. A) 18S rDNA ala alusel määratud OTUde arv ja temperatuur; B) ITS2 piirkonna alusel määratud OTUde arv ja temperatuur. Hõimkondade kaupa on toodud välja eri sügavuskihtides OTUde arv. Igas sügavuskihis on vähemalt kolme bioloogilise paralleeli OTUde arvud, mille pealt on leitud keskmine OTUde arv (punane punkt). Punaste joontega on näidatud suurim ja väikseim väärtus igas sügavuskihis.

4.4 Seente elukeskkond ja ökoloogiline roll

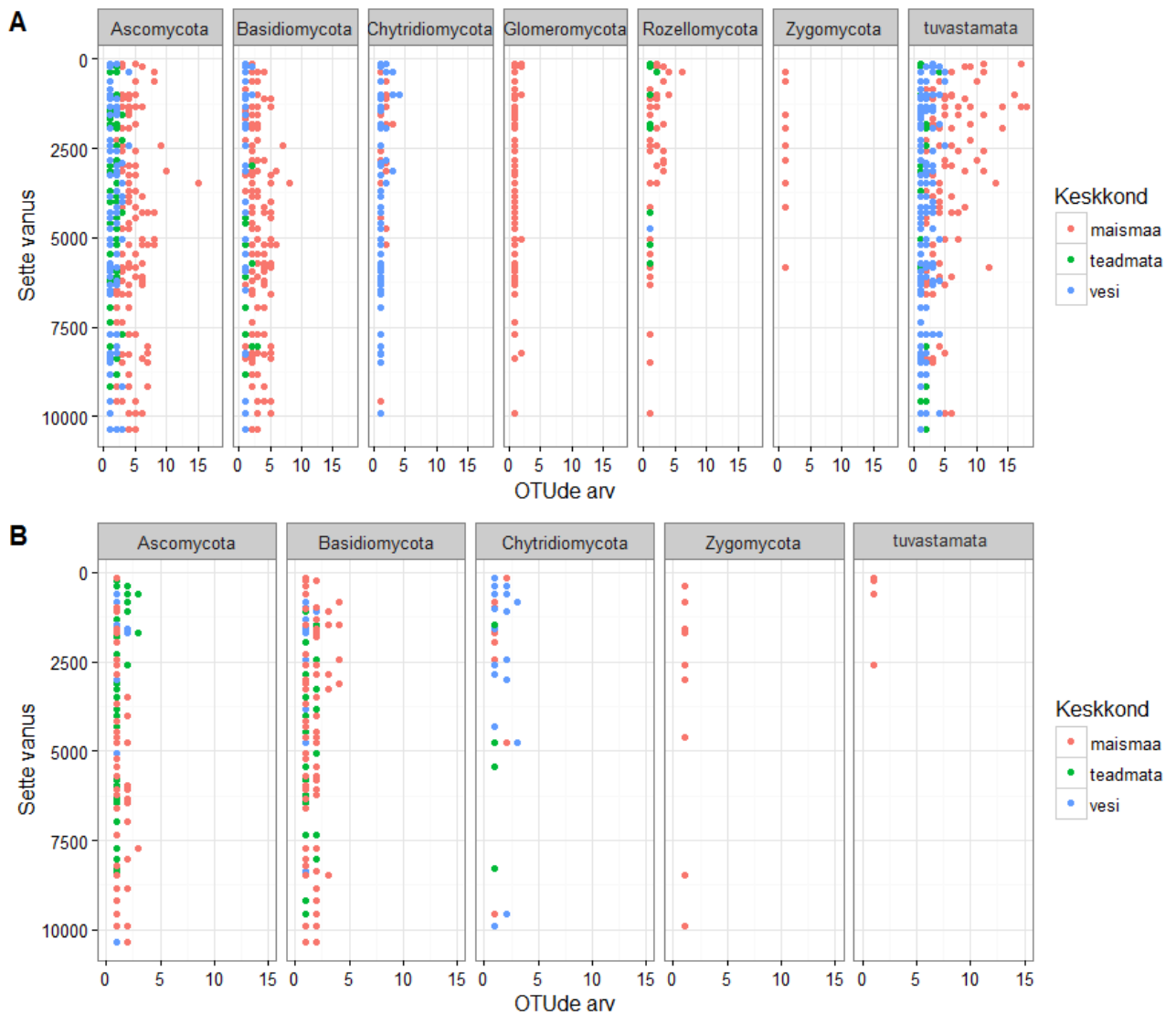
ITS2 ja 18S rDNA ala abil tuvastatud organismide hüpoteetiline elukeskkond on esile toodud joonistel 13 ja 14. Mõlema andmestiku puhul määrati hüpoteetiline elukeskkond OTUdele, mis esinesid vähemalt 4 proovis. Selliseid enim proovides esinenud OTUsid oli ITS andmestikus 237 OTUt ja 18S rDNA andmestikus 258 OTUt. Joonisel 13 on näha, et universaalste 18S rDNA ala praimeritega suudeti tuvastada enim veelise keskkonnaga seotud organisme, ligi 60% tuvastatud OTUdest. Veelise eluviisiga organismide hulka kuulusid enamikus rühmade *Alveolata*, *Excavata*, *Archaeplastida*, *Stramenopiles* ja *Fungi* esindajad. Erinevaid maismaalise eluviisiga organisme leidis 18S rDNA andmestikus ligi 35%. Nende hulka kuulusid nii gruppide *Embryophyta* (maismaataimed), *Metazoa* (loomad) kui ka *Fungi* (seened) esindajad. 18S rDNA seente andmestiku erinevatest OTUdest enamiku moodustasid maismaalise elukeskkonnaga seened (~55%). Samas veelise ja hetkel teadmata elukeskkonnaga seened jaotusid praktiliselt võrdselt (vastavalt 13 ja 12 OTUt). ITS2 andmestiku puhul võib näha suures plaanis sarnast organismide elukeskkondade jaotumist kui 18S rDNA seente andmestiku puhul. Kõige enam leidis maismaalise eluviisiga seeni (~70%), samas kui veelise elukeskkonnaga seened moodustasid vaid 17% erinevatest OTUdest (Joonis 13).



Joonis 13. ITS2 ja 18S rDNA fragmentide abil tuvastatud organismide elukeskkond. Arvesse võeti vähemalt 4 proovis esinenud OTUd, millele määrati NCBI's kõige lähima järjestuse alusel hüpoteetiline elukeskkond. Info puudumisel jäi elukeskkond tuvastamata. Kõigil andmestikel on kokku erineva arv OTUsid, mis on märgitud tulpade kohal.

Seente puhul vaadeldi ka nende elukeskkonna asetust suurematesse hõimkondadesse ning erineva elukeskkonnaga seente muutusi ajas (Joonis 14). Mõlema andmestiku puhul on näha mõningaid sarnasusi. Nii ITS2 kui ka 18S rDNA seente andmestikust on joonisel 14 näha, et hõimkonda *Chytridiomycota* kuuluvad põhiliselt veelise elukeskkonnaga seened. Samas leidub 18S rDNA ala abil tuvastatud *Chytridiomycota* hõimkonnas ka raskesti määratava elukeskkonnaga seeni. Samuti on mõlemas andmestikus enim maismaalise elukeskkonnaga seeni hõimkonnas *Basidiomycota*. Mõlemas andmestikus tuvastatud *Zygomycota* hõimkonna esindajad on samuti maismaalise eluviisiga. ITS2 andmestikus hõimkonda *Ascomycota* kuuluvad seened on nii veelise kui maismaalise elukeskkonnaga ning nende mitmekesisus on suur võrreldes teiste

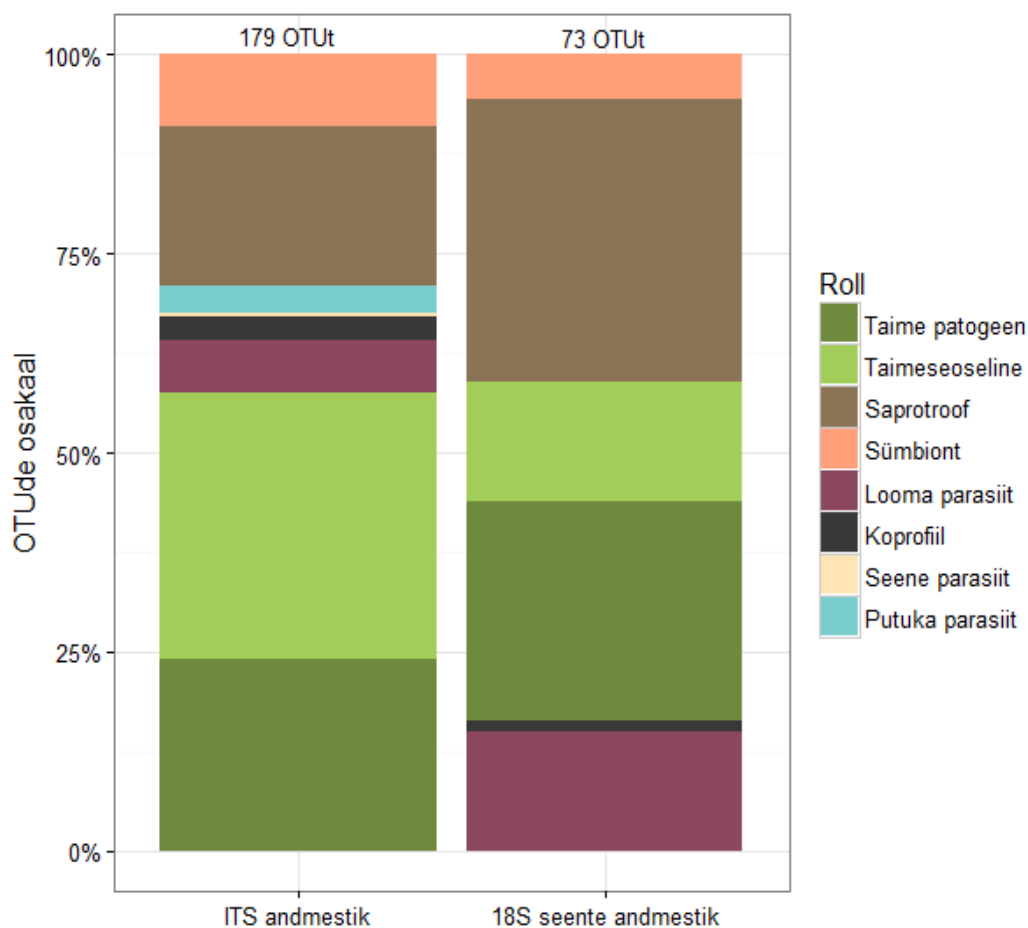
hõimkondadega. Samas aga on 18S rDNA seente andmestikus hõimkonda *Ascomycota* kuuluvate seente mitmekesisus väike ja nad on põhiliselt maismaalise eluviisiga. 18S rDNA fragmendi abil seente tuvastamine ei ole võimaldanud identifitseerida veelise eluviisiga seeni. Hõimkonna *Ascomycota* puhul on ka näha, et erinevatel ajaperioodidel on veelise eluviisiga seente mitmekesisus olnud küllaltki ühtlane (Joonis 14A). Samas on *Ascomycota* grupi maismaalise elukeskkonnaga seente mitmekesisus muutunud ajas sarnaselt hõimkonda *Basidiomycota* kuuluvate seente mitmekesisusega (Joonis 14A). Joonisel 14A on näha, et hõimkondades *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* ja *Rozellomycota* on ajavahemikul 2500-3750 aastat tagasi toimunud seente mitmekesisuse muutused. Sarnane muutus on vaadeldaval ajaperioodil toimunud ka 18S rDNA seente andmestiku hõimkonnas *Basidiomycota* (Joonis 14B). Sarnaseid seente mitmekesisuse muutusi on näha ka ajavahemikel 7500-8500 ja 8750-10 000 aastat tagasi hõimkondades *Ascomycota*, *Basidiomycota* ja identifitseerimata seente grupis. Teistes hõimkondades pole tuvastatud piisaval määral seente OTUsid, et näha muutusi neil ajaperioodidel. Samas on identifitseerimata seente grupis ITS2 andmestiku puhul näha, et maismaalise elukeskkonnaga seened on ülemistes kihtides palju mitmekesisemad kui sügavamates kihtides. See tuleneb tõenäoliselt sellest, et ülemistes kihtides on seente DNA vähem lagunenuk kui sügavamal (Joonis 14A).



Joonis 14. Hõimkondade tasemel seente mitmekesisus ja elukeskkond erinevatel ajaperioodidel. A) ITS 2 andmestiku erinevate OTUde elukeskkond hõimkondade kaupa; B) 18S rDNA seente andmestiku erinevate OTUde elukeskkond hõimkondade kaupa. Arvesse võeti vähemalt 4 proovis esinenud OTUd, millele määrati NCBI's kõige lähema OTU elukeskkonna alusel eluviis.

ITS2 ja 18S rDNA alaga tuvastatud erinevad OTUd grupeeriti funktsionaalsetesse rühmadesse (Joonis 15). Mõlema andmestiku puhul määrati ökoloogiline roll OTUdele, mis esinesid vähemalt 4 proovis. Jooniselt 15 on näha, et mõlemas andmestikus on enim esinenud taimepatogeene, saprotroofe ja taimeseoselisi seeni. ITS2 ala abil on tuvastatud 2x enam taimepatogeene ja ligi 6x enam taimeseoselisi seeni kui 18S rDNA ala korral. Taimeparasiitide ja taimeseoseliste seente nimistu oli suhteliselt lai, kuid enim leidus perekondade *Betula* (kask), *Pinus* (mänd), *Picea* (kuusk) parasiite/taimeseoselisi seeni ja sugukonna *Orchidaceae* (käpalised)

seoselisi seeni. Loomade parasiite on mõlemas andmestikus tuvastatud praktiliselt võrdselt (ITS2 andmetes 12 OTUt ja 18S rDNA seente andmetes 11 OTUt). Loomade parasiidid jaotusid konnade, kalade ja imetajate patogeenideks. Koprofiilsed ja sümbiontsed seened olid samuti esindatud mõlemas andmestikus, millest 18S seente andmestikus esines vaid 1 OTU. ITS2 abil tuvastatud OTUd aga olid oma rollilt tunduvalt mitmekesisemad kui 18S rDNAGA tuvastatud seened. ITS 2 andmestikku kuulus lisaks ka seente ja putukate parasiite (Joonis 15).



Joonis 15. Seente roll ITS ja 18S seente andmestikes. Arvesse võeti vähemalt 4 proovis esinenud OTUd.

5. Arutelu

Töö põhieesmärgiks oli täiendada senist paleolimnoloogilist andmestikku 18S rDNA ja ITS2 ala järjestuste alusel määratud seeneliikide mitmekesisusega. Samuti töötada välja meetoodika, mille abil oleks võimalik kirjeldada ajaloolises settes leiduva DNA abil seente liigilist koosseisu. Lielais Svetinu järve setetest on juba varem uuritud õietolmu ja muid palünomorfe, mõõdetud ^{14}C radiosüsinikuga sette vanust, koostatud litostratigraafia ja määratud orgaanilise aine sisaldus (Stivrans jt., 2014). Järve ajaloolised põhjasetted on suhteliselt uurimata valdkond ja nende täiendamine DNA-põhise andmestikuga võimaldaks luua detailsemaid seoseid organismide, elukeskkondade ja ajaperioodide vahel (Pedersen jt., 2014; Bellemain jt., 2013). Selleks optimeeriti algset PCRi protokoll (Lisa 2), mille käigus otsiti sobivaid praimerite seondumistemperatuure ja testiti erinevaid DNA koguseid, BSA, DMSO, praimerite kontsentratsioone. Kuna sügavamatest kihtidest amplifitseerimine oli raskendatud, siis kasutati PCR I astme produkti kontsentreerimiseks ja puhastamiseks Select-A-Size DNA Clean and Concentrator kitti. Visuaalselt andis PCR I astme kontsentreerimine/puhastamine ja “long PCR” praimer 2x lahjema (2,5 μM) indeksi kasutamine paremaid tulemusi (Joonis 9). Samas, kasutatud meetodil ei olnud statistiliselt olulist mõju OTUde arvule ja Shannoni indeksitele (Lisa 7).

Vaadeldi ka sügavuse mõju, kuna eeldati, et sügavamates kihtides on DNA rohkem lagunenu ja seetõttu ka PCRil raskemini amplifitseeritav. Mõlemast andmestikust tuvastati oluline sügavuse mõju OTUde arvule, kuid vastupidiselt Shannoni indeksile selline mõju puudus. See tulenes asjaolust, et Shannoni indeksi arvutamisel arvestatakse OTU lugemite osakaalu proovi lugemite arvust (Oksanen, 2016). Lugemite arv aga on tugevalt sõltuvuses amplifitseerimise efektiivsusest ning ei pruugi esindada tegelikku DNA kogust (Peng jt., 2015). Peng jt (2015) tõid ka välja, et sellised probleemid esinevad eriti suurema PCR tsüklite arvu puhul, mida kasutatakse madala või kahjustunud DNA amplifitseerimiseks. Seetõttu ei kasutatud antud töös sügavusgraafikute tegemisel OTUde osakaale, vaid OTUde arvu. Nonlinear Mixed-Effects mudeli põhjal võib öelda, et sügavus oli statistiliselt oluline. Sügavuse mõju OTUde arvule oli ka näha sügavusgraafikul (eriti tuvastamata seente gruppis), kus hõimkondadesse jaotunud mitmekesisus vähenes sügavuse kasvades (Joonis 12). Sellest tulenevalt võib järeldada, et DNA oli sügavamates kihtides rohkem lagunenu. Kuna sügavamates kihtides on DNA tõenäoliselt rohkem lagunenu (Hofreiter jt., 2001) ja ka PCR oli alates 500 cm sügavusest settest halvem,

siis tuleks edaspidi testida ka erinevaid DNA ekstraheerimise meetodeid. Samuti võiks eksperimenteerida PCRi tsüklite arvuga. Nii Bellemain jt (2013) kui ka Lydolph jt (2005) kasutasid oma külmunud pinnase paleouuringutes PCRil 40-55 tsüklit, mis aitaks suurendada vähese DNA amplifikatsiooni (Peng jt., 2015). Samas võib see tuua kaasa mitmeid reostuse ja amplifitseerimisvigadega seotud probleeme (Peng jt., 2015). Siiski, käesolevast töös saadud tulemuste põhjal võib väita, et Lielais Svetinu järve ajaloolistest setetest on võimalik tuvastada seene kooslusi läbi terve jääajajärgse perioodi.

18S rDNA ja ITS2 regiooni valiku mõju seente mitmekesisuse tuvastamisele hinnati esmalt sekveneerimisandmete kvaliteedi abil. Vaadeldi, kas teise põlvkonna sekveneerimisel kasutatav sekveneerimisügavus on olnud piisav, et hinnata seente liigirikkust proovides. Selleks kasutati liigirikkuse indekseid Chao1 ja ACE (O'Hara, 2005; Oksanen jt., 2016). Kuna antud andmestikes ei leidunud üksikuid lugemeid ja selle tulemusel oli Chao1 võrdne proovides esineva OTUde arvuga, siis võib järeldada, et vaadeldavate proovide liigirikkus oli jõudnud küllastavuseni. Sama tulemuse andis ka ACE, mille puhul oli välja toodud ka veamäärad (se. ACE). Sekveneerimisügavus oli piisav, et tuvastada kõik, mis suudeti amplifitseerida. Seejärel vaadeldi OTUde ja lugemite arvu omavahelisi suhteid, eeldades teiste uurimuste põhjal, et mida rohkem OTUsid, seda enam lugemeid (Bazzicalupo jt., 2012). Pearsoni korrelatsioon näitas selle seose olemasolu ITS2 ($r=0,57$, $p<0.01$) ja 18S rDNA ($r=0,4$, $p<0.01$) andmestikes. Samas aga 18S rDNA seente andmestikus seos puudus ($r=0,05$, $p>0.05$), OTUsid oli keskmiselt alla 10 OTU proovi kohta ja lugemite arv hüplik. See võis tuleneda praimerite kallutusest mingisuguse teise grupi järjestuse poole. Samuti segab seente amplifikatsiooni taimse või loomse DNA esinemine proovis (Anderson jt., 2003). Kuna tegu oli universaalse 18S rDNA praimeriga, siis amplifitseeriti seda materjali, mida leidis proovis enim. Sellest tulenevalt kõikus tunduvalt ka 18S rDNA seente lugemite arv. Samas aga suudeti 18S rDNA ja ITS2 ala kasutades tuvastada tunduvalt enam erinevaid seente OTUsid (vastavalt 182 ja 767 OTUt) kui varasemates pinnase paleouuringutes (Bellemain jt., 2013; Lydolph jt., 2005; van Geel jt., 2003). Lydolph jt (2005) kasutasid vanemat klooneerimisel põhinevat (356 kloon) meetodit, samas kui Bellemain jt (2013) otsustasid teise põlvkonna sekveneerimise kasuks. Bellemain jt (2013) suutsid tuvastada vaid 75 erinevat OTUt, kuid nende poolt uuritav materjal oli tunduvalt vanem (16 000-32 000 a vanune) võrreldes vaadeldava uuringuga (kuni 11 000 aastat). Seetõttu võib eeldada võimalikku DNA tugevat lagunemist sügavamates kihtides või kasutatavate praimerite väga erinevat efektiivsust. Antud töö sekveneerimisandmete kvaliteet oli hea ja võimalikud suuremad lugemite

arvu muutused (18S rDNA seente andmestikus) tulenesid suuresti praimerite amplifitseerimisvigadest või kallutatusest mingisuguse eelistatud grupi poole. Tuvastatud OTUde arvu ja andmete kvaliteedi alusel võib öelda, et teine hüpotees pidas samuti paika ning DNA põhised meetodid annavad detailsema ülevaate seenekooslustest kui mikroskoopia meetodid. Seda hüpoteesi toetab ka uurimus (van Geel jt., 2003), kus suudeti tuvastada pinnasest vaid 7 erinevat tüüpi seente mikrofossiile mikroskoopia meetoditega.

Meetodi usaldusväärsuse hindamiseks võrreldi bioloogilisi paralleele omavahel. Bioloogiliste paralleelide vaheliste erinevuste uurimisel Nonlinear Mixed-Effects mudeliga selgus, et paralleelid olid omavahel erinevad. Lähemal uurimisel TukeyHSD-ga selgus, et kõigis andmestikes erines esimene bioloogiline paralleel tugevalt teistest. Võimalik põhjuse selgitamiseks hinnati PCR meetodite mõju, mis aga puudus täiesti. Nii võib esimese paralleeli erinevuse põhjuseks teistest tuua asjaolu, et erinevus tulenes paralleelide proovivõtukohest settes. Proovid koguti vastavast sügavuskihist keskelt ja kahelt poolt äärest. Esimene bioloogiline paralleel oli kogutud alati keskelt, kus alumine settesüdamiku põhi oli vedelam ja liikuvam. Samas võis esimese bioloogilise paralleeli OTU suurem mitmekesisus tuleneda ka sellest, et keskmises osas leidis rohkem bioloogilist materjali. Samuti võis erinevus olla tulenenud settelasundi horisontaalsest ebaühtlusest. Sellise keskkonnaproovides esineva erinevuse tõttu on enamasti uuringutes (Singh jt., 2012; Monard jt., 2013) kogutud proovidest eraldatud DNA kokku segatud ja teostatud vaid PCRil erinevaid paralleele. Kuid samas, kuna soovime tuvastada mitmekesisust vaadeldavates sügavuskihtides, siis oleks õigem kasutada tegelikke bioloogilisi paralleele.

Mitmed uurimused (Singh jt., 2012; Anderson jt., 2003; Schoch jt., 2012) on kasutanud nii 18S rDNA kui ITS2 ala primereid seente mitmekesisuse hindamiseks erinevatest keskkondadest (muld, sete, muda). Schoch jt (2012) pakkusid välja, et ITS2 ala puhul peaks kasutama kombinatsiooni mitmetest sellele alale konstrueeritud praimeritest. Seetõttu kasutasimegi kombinatsiooni mitmetest ITS2 ala praimeritest (Tedersoo jt., 2014) ja lisaks kasutasime uusi eeldatavalt universaalsemaid 18S rDNA ala primereid (Tedersoo jt., 2015). Universaalse 18S rDNA ala praimeritega tuvastatud organismidest 21% kuulusid seente hulka. Sellist leidu toetab ka Singh jt (2012) uurimus, kus 18S rDNA ala primereid tuvastades leiti, et seened on üks domineerivatest organismidest süvamere setetes. Samas ITS2 ala primereid kasutades tuvastati 5,3x enam seente OTUsid kui universaalsete 18S rDNA praimeritega. Selline erinevus tuleneb

osalt sellest, et ITS2 ala suudab seente gruppe eristada kuni liigi tasemeni, samas kui 18S rDNA ala vaid perekonnani (Anderson ja Cairney, 2004). Samuti on erinevuse põhjuseks rohke taimse DNA olemasolu (Anderson jt., 2003), mida universaalsete 18S rDNA praimerite puhul eelistatakse amplifitseerimisel. Mitmekesisuse seisukohalt olid ITS2 ala praimerid efektiivsemad (Shannoni indeks 2-3) kui 18S rDNA omad (Shannoni indeks 2, seentel 1,3). Nii võib öelda, et ITS2 ala praimerid tuvastasid seente mitmekesisust paremini kui 18S rDNA praimerid.

Liigirikkuse seisukohalt tuvastati mõlema ala praimeritega kokku 8 seente hõimkonda, millest 5 kattusid mõlemas andmestikus. ITS2 ala kasutades suudeti kirjeldada lisaks 2 hõimkonda (*Glomeromycota*, *Chytridiomycota*), milles esines rohkelt OTUsid. 18S rDNA piirkonda kasutades leiti ainult üks väheste OTUdega hõimkond (*Blastocladiomycota*). Kõige domineerivamateks hõimkondadeks olid mõlemal juhul *Basidiomycota* ja ITS2 andmestikus ka *Ascomycota* (Joonis 13). Nii Singh jt (2012) kui ka Lydoplh jt (2005) näitasid, et ITS2 ja 18S rDNA alade praimerid mõlemad amplifitseerivad eelistatult *Ascomycota* ja *Basidiomycota* hõimkonda kuuluvaid seeni. Kui vaadelda liigirikkust perekonna tasemel, siis suudeti ITS2 praimeritega tuvastada 343 ja 18S rDNA praimeritega 29 seente perekonda. Samas esinesid mõlemas andmestikus samad domineerivad seente klassid. Nii võib väita, et 18S rDNA ala praimeritega suudeti kirjeldada domineerivad seente grupid, kuid üsna suur osa seente liigirikkusest jäi tuvastamata. Sarnast olukorda võib näha ka tuvastatud seente elukeskkonna ja rolli graafikutelt (Joonis 13; Joonis 15). Suures plaanis tuvastati mõlema ala praimeritega samas proportsioonis maismaal ja vees elutsevaid seeni. Mõlemal juhul oli maismaalise eluviisiga seente osakaal suurim. Samas anaeroobse eluviisiga seeni leidis nii veelise *Chytridiomycota* kui ka maismaalise (*Malassezia*) eluviisiga seente seas. Sellised tulemused langevad kokku Cathrine ja Raghukumar (2009) uurimusega, kus leiti, et mere settes esines lisaks *Chytridiomycota* hõimkonda kuuluvatele nitrifitseerijatele ka palju maismaalise eluviisiga seeni. Põhjuseks võib pidada võimalikku maismaaliste liikide kohandumist veekeskkonnaga (Cathrine ja Raghukumar, 2009). 18S rDNA praimeritega suudeti tuvastada ka enamik ITS2 alaga tuvastatud seente rollidest. Samas aga oli ITS2 ala abil tuvastatud seente rollid mitmekesisemad. Leidis ka seente endi ja putukate parasiite lisaks taimeparasiitide, taimeseoseliste ja loomparasiitide gruppidele (Joonis 15). Tuvastatud seentest esines enim taimeparasiite ja taimeseoselisi seeni, mis on vastavuses suurema maismaalise eluviisiga seente esinemisega. Koprofiilsete seente esinemine andis tunnistust ka megafauna (suuremad imetajad) olemasolust järve ümbruses. Sarnaseid seente funktsioone on tuvastatud ka Beeringi külmunud pinnase uuringutest (Bellemain jt., 2013;

Lydolph jt., 2005). Nii on näha, et 18S rDNA ala sobib kasutamiseks eelkõige juhtudel, kui soovitakse eukarüootset liigirikkust tuvastada suuremate gruppide tasemel. ITS2 ala aga võimaldab kirjeldada suuremat liigirikkust ja läbi selle leida seoseid erinevate organismide vahel. Sellest tulenevalt pidas paika ka kolmas hüpotees.

Lydolph jt. (2005) suutis 18S rDNA ala praimerite abil tuvastada seoseid identifitseeritud seente ja teiste organismide (taimede) vahel. Kirjeldati ka taimestiku muutusi erinevatel ajaperioodidel (Lydolph jt., 2005). Nii leiti ka vaadeldavas töös seoseid 18S rDNA praimeritega tuvastatud taimede ja ITS2 ala abil tuvastatud seente liikide vahel. 18S rDNA praimeritega tuvastati nii okaspuid kui ka õis- ja lehtsammaltaimi. Samal ajal leidis ITS2 andmestikus enim taimeperekondade *Pinus*, *Picea*, *Betula* ja *Orhidaceae* parasiitseid seeni. Samade puuperekondade olemasolu vaadeldava järve ümber tõendab ka Stivrins jt (2014) uurimus, kus on kirjeldatud Lielais Svetinu järve ümbritsevaid puuliike. Nii on võimalik luua seoseid 18S rDNA abil tuvastatud eukarüootide ja ITS2 ala abil kirjeldatud seente liikide vahel. Seeläbi on võimalik kirjeldada seoseid seente ja teiste organismide vahel (Bellemain jt., 2013). Sügavusgraafikutelt loodeti ka näha võimalikke seene koosluste muutusi ajas (Joonis 12, Joonis 14). Nähti, et veelise eluviisiga seente mitmekesisus on olnud erinevatel ajaperioodidel stabiilne. Samas on näha, et maismaalise eluviisidega seente mitmekesisus on olnud muutlik. Otseseid seoseid temperatuuri muutustega erinevatel ajaperioodidel ei leitud. Maismaalise elupaigaga seente esinemine settes näitab pidevat maismaalise materjali (puu, lehed, putukad, loomne materjal) sissevoolu järve, kus vastav materjal aja jooksul settib (Wurzbacher jt., 2010). Maismaaliste seente mitmekesisuse muutused võisid olla tingitud ka amplifitseerimisvigadest või nendes kihtides DNA kiiremast lagunemisest. Siinkohal pole amplifitseerimisviga väga tõenäoline põhjus, kuna sarnased muutused on toimunud vähemalt kahes suuremas hõimkonnas (Joonis 14). Seente mitmekesisuse muutusi erinevatel ajaperioodidel tuleks hinnata tulevikus samast järvest võetud õietolmu andmetega koos. Sellist lähenemist proovivõtukoha fauna ja floora uurimiseks on soovitanud ka nii Miras jt (2015), van Geel jt (2003) kui ka Pedersen jt (2015).

Töös välja toodud tulemuste põhjal esitada järgmised järeldused. Vaadeldava töö tulemused pakuvad uudset informatsiooni seene koosluste mitmekesisuse ja liigirikkuse kohta järve põhjasettes. Lielais Svetinu järvest kogutud setteproovide amplifitseerimiseks 18S rDNA ja ITS2 ala praimeritega, optimeeriti olemasolevat protokollit. Sügavamate kihtide amplifitseerimiseks leiti, et vajalik on kasutada PCR I astme produkti praimerijääkidest puhastamist ja

kontsentreerimist. Seente tuvastamine DNA põhiste meetoditega jääajajärgsetest setetest oli edukas. Üle 11 m sügavuse setete puhul tuleks ka katsetada PCRi tsüklite arvu tõstmist ja erinevaid DNA ekstraheerimise meetodeid.

Universaalsete 18S rDNA ala praimerite kasutamine on põhjendatud olukorras, kus eesmärgiks on tuvastada kogu proovides esinev eukarüootne mitmekesisus suuremate rühmade tasemel. Neid primereid on kasulik rakendada ka siis, kui on soov uurida seente ja teiste eukarüootsete organismide vahelisi seoseid. ITS2 ala praimerite kasutamine võimaldab tuvastada järvesetetes seenekoosluste mitmekesisust ja liigirikkust kuni liigi tasemeni. Kõige sobivam oleks rakendada mõlemaid alasid koos juhul, kui eesmärgiks on uurida seente rolli ja seoseid teiste organismidega. Seente mitmekesisuse muutuste tõlgendamiseks erinevatel ajaperioodidel tuleks töös esitatud andmeid tulevikus võrrelda ka õietolmuanalüüsist saadud andmete ja teiste mikrofossiili andmetega.

Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli täiendada järve põhjasette paleolimnoloogilist andmestiku, kasutades 18S rDNA ja ITS2 ala järjetusi. Töö lisaeesmärkideks oli: 1) koostada optimeeritud PCRi protokoll, 2) uurida 18S rDNA ja ITS2 ala tulemuslikkust mitmekesisuse ja rolli tuvastamisele.

Töö käigus optimeeriti PCRi protokoll järve põhjasetetest seente DNA amplifitseerimiseks. Sügavamatest kihtidest DNA amplifitseerimiseks on vajalik kasutada PCR I astme produkti puhastamist praimerijääkidest ja kontsentreerimist. Paremaid amplifitseerimistulemusi andis “long PCR” praimeri kontsentratsiooni 2,5 µM kasutamine. Töö tulemused näitavad, et ITS2 ja 18S rDNA piirkonna järjestusi kasutades on seenekooslused Lielais Svetinu järve ajaloolistes setetes tuvastatavad, kuigi seente mitmekesisus väheneb sügavuse kasvul.

ITS2 fragmendi abil seene koosluse tuvastamine annab täpsema taksonoomilise kuuluvuse ja mitmekesisuse kui 18S rDNA ala kasutamine. Universaalsete 18S rDNA praimeritega tuvastatud seened moodustasid 21% kõigist eukarüootidest. Samas, 18S rDNA ala abil oli võimalik kirjeldada enamik hõimkonda *Basidiomycota* kuuluvatest ning ITS2 alaga tuvastatud seeneklassidest. Kokku tuvastati 529 liiki seeni, mis kuulusid 8 hõimkonda. 18S rDNA ja ITS2 ala kooskasutamine võimaldas teha järeldusi järve ümbritseva fauna ja floora kohta. ITS2 alaga tuvastati enim perekondade *Pinus*, *Picea* ja *Betula* taimeparasiite ning 18S rDNA ala abil tuvastati ka okaspuid. Mõlema ala abil kirjeldatud seentel domineeris maismaaline eluviis. Kõige enam esines taimeparasiitseid, taimeseoselisi ja saprotroofseid seeni. Herbivoorsete loomade esinemist tõendas koprofiilsete seente olemasolu. ITS2 alaga tuvastati ka putukate ja seente parasiite.

Tulemuste põhjal võib järeldada, et töös kasutatud ITS2 ala praimerid võimaldavad hinnata seente mitmekesisust järve põhjasetetes kuni liigi tasemeni ning võimalikud peremeesorganismid annab infot üldisema paleoelustiku kohta.

Autor soovib edaspidi sügavamatest kihtidest DNA amplifitseerimiseks testida erinevaid PCRi tsüklite arve ja DNA ekstraheerimismeetodeid. Seente mitmekesisuse muutuste tõlgendamiseks erinevatel ajaperioodidel tuleks saadud andmeid tulevikus võrrelda õietolmu andmetega.

Assessment of fungal diversity in post-glacial lake sediment by sequences of ITS2 and 18S rDNA region

Liisi Talas

Summary

The diversity and role of the fungi in lake sediment is rather unexplored field of mycology. It is proposed and shown that fungal species observed in ancient DNA associated with host allow us to reconstruct biodiversity of paleoenvironment. Reconstructing past environment is essential to assess the human impact, environmental changes and changes in fauna and flora (Pedersen jt., 2014).

The main aim of the current master's thesis was to compile palaeological data from post-glacial lake sediment by 18S rDNA and ITS2 region primers. The objectives of this study were (1) to compile optimized PCR protocol, (2) to explore the impact of the choice of the 18S rDNA and ITS region on detection of diversity and role of the fungi.

PCR protocol was compiled for the amplification of fungi from sediment. DNA amplification from deeper layers require primer residue cleaning and DNA concentrating for PCR I stage products. Amplification outcome improved using 2,5 µM long PCR primers. As a result, fungal communities are identifiable from post-glacial lake sediment by ITS2 and 18S region primers.

ITS2 fragment usage leads us to more accurate taxonomical affiliation and diversity of fungi than 18S rDNA region. Fungi formed 21% of eukaryotes by universal 18S rDNA primers. 18S rDNA region enabled to assess most classes of fungi belonging to phyla *Basidiomycota* that were identified by ITS2 region. Total of 343 genus of fungi representing 8 phyla were detected. Using both 18S rDNA and ITS2 regions, it allows us to create associations with fauna and flora around the lake. Conifers were detected by universal 18S rDNA region primers, compatible to presence of genus *Pinus* and *Picea* plant-parasitic fungi by ITS2 region primer. Most dominant fungi were from terrestrial habitat and presumed plant pathogens, plant-associates and saprotrophs received by both region primers. Insect-parasitic and fungal-parasitic fungi were detected by ITS2 region.

Results indicate that ITS2 region is able to identify more accurate taxonomical affiliation of fungi. Nevertheless, both regions should be used to identify and create relations between fungi and other organism for reconstruction of paleoenvironment. Further analysis of sediment fungi and comparison with pollen analysis is needed to interpret changes in fungal communities.

Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajat Veljo Kisandit abivalmiduse, väärtuslike nõuannete, andmeanalüüsi teostamiseks vajaliku abi ja laboritöös juhendamise eest. Samuti soovin tänada Anu Kisandit huvitavate arutelude, toetuse, asjalike märkuste ja abi eest laboritöös. Tänan ka kogu Tehnoloogiainstituudi kollektiivi sõbraliku ja abivalmi töökeskkonna tekitamise eest.

Soovin tänada ka kõiki mu sõpru ja lähedasi, kes on igati toetanud mind mu õpingute ajal.

Töö valmis projekti "Veekogude ajalooliste mikroobsete koosluste analüüs ning selle muutuste seosed kliimamuutustega fossiilse DNA põhiste analüüside abil (PUT134; 1.01.2013–31.12.2016)" raames.

Kasutatud kirjandus

Kasutatud artiklid

Ali, E. H. and Abdel-Raheem, A. (2003). Distribution of zoosporic fungi in the mud of major Egyptian lakes. *J. Basic Microb.* 43(3): 175–184.

Anderson, I. C. and Cairney, J. W. G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: Increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6(8): 769–779.

Anderson, I. C., Campbell, C. D. and Prosser, J. I. (2003). Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ. Microbiol.* 5(1): 36–47.

Baldauf, S. L. (2008). An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J. Syst. Evol.* 46(3): 263–273.

Bazzicalupo, A. L., Bálint, M. and Schmitt, I. (2013). Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecol.* 6(1): 102–109.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. and Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol.* 10: 189.

Bellemain, E., Davey, M. L., Kauserud, H., Epp, L. S., Boessenkool, S., Coissac, E., Geml, J., Edwards, M., Willerslev, E., Gussarova, G., Taberlet, P. and Brochmann, C. (2013). Fungal palaeodiversity revealed using high-throughput metabarcoding of ancient DNA from arctic permafrost. *Environ. Microbiol.* 15(4): 1176–89.

Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M. and Kauserud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 13(2): 218–224.

Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics.* 30(15): 2114–2120.

- Brown, T. A. and Barnes, I. M. (2015). The current and future applications of ancient DNA in Quaternary science. *J. Quaternary Sci.* 30(2): 144–153.
- Cathrine, S. J. and Raghukumar, C. (2009). Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. *Mycol. Res.* 113(1): 100–109.
- Edgcomb, V. P., Beaudoin, D., Gast, R., Biddle, J. F. and Teske, A. (2011). Marine subsurface eukaryotes: The fungal majority. *Environ. Microbiol.* 13(1): 172–183.
- Fernandes, I., Pereira, A., Trabulo, J., Pascoal, C., Cássio, F. and Duarte, S. (2015). Microscopy- or DNA-based analyses: Which methodology gives a truer picture of stream-dwelling decomposer fungal diversity? *Fungal Ecol.* 18: 130–134.
- Gleason, F. H., Küpper, F. C., Amon, J. P., Picard, K., Gachon, C. M. M., Marano, A. V., Sime- Ngando, T. and Lilje, O. (2011). Zoosporic true fungi in marine ecosystems: A review. *Mar. Freshwater Res.* 62(4): 383–393.
- Heip, C. H. R., Herman, P. M. J., Soetaert, K. (1998). Indices of diversity and evenness. *Oceanis.* 24 (4): 80-83.
- Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M. and Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* 2(5): 353–9.
- Ishida, S., Nozaki, D., Grossart, H. P. and Kagami, M. (2015). Novel basal, fungal lineages from freshwater phytoplankton and lake samples. *Environ. Microb. Rep.* 7(3): 435–441.
- Kagami, M., De Bruin, A., Ibelings, B. W. and Van Donk, E. (2007). Parasitic chytrids: Their effects on phytoplankton communities and food-web dynamics. *Hydrobiologia.* 578(1): 113–129.
- W. Li, L. Fu, B. Niu, S. Wu and J. Wooley. (2012). Ultrafast Clustering Algorithms for Metagenomic Sequence Analysis. *Brief. Bioinform.* 13 (6): 656-668.
- Lydolph, M. C., Jacobsen, J., Arctander, P., Gilbert, M. T. P., Gilichinsky, D. A., Hansen, A. J., Willerslev, E. and Lange, L. (2005). Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Appl. Environ. Microb.* 71(2): 1012–1017.
- Medeiros, A. O., Pascoal, C. and Graça, M. A. S. (2009). Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. *Freshwater Biol.* 54(1): 142–149.

- Mille-Lindblom, C., Fischer, H. and Tranvik, L. J. (2006). Antagonism between bacteria and fungi: Substrate competition and a possible tradeoff between fungal growth and tolerance towards bacteria. *Oikos*. 113(2): 233–242.
- Miras, Y., Beauger, A., Lavrieux, M., Berthon, V., Serieyssol, K., Andrieu-Ponel, V. and Ledger, P. M. (2015). Tracking long-term human impacts on landscape, vegetal biodiversity and water quality in the Lake Aydat catchment (Auvergne, France) using pollen, non-pollen palynomorphs and diatom assemblages. *Palaeogeog. Palaeoclim. Palaeoecol.* 424: 76–90.
- Monard, C., Gantner, S. and Stenlid, J. (2013). Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84(1): 165–175.
- Mouton, M., Postma, F., Wilsenach, J. and Botha, A. (2012). Diversity and Characterization of Culturable Fungi from Marine Sediment Collected from St. Helena Bay, South Africa. *Microb. Ecol.* 64(2): 311–319.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E. and Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol. Lett.* 296(1): 97–101.
- O'Hara, R. B. (2005). Species richness estimators: how many species can dance on the head of a pin? *J. Anim. Ecol.* 74: 375–386.
- Ondav, B. D., Bergman, N. H., Phillippy A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*. 12: 385.
- Orsi, W., Biddle, J. F. and Edgcomb, V. (2013). Deep Sequencing of Subseafloor Eukaryotic rRNA Reveals Active Fungi across Marine Subsurface Provinces. *PLoS ONE*. 8(2): e56335.
- Parducci, L., Matetovici, I., Fontana, S. L., Bennett, K. D., Suyama, Y., Haile, J., Kjær, K. H., Larsen, N. K., Drouzas, A. D. and Willerslev, E. (2013). Molecular- and pollen-based vegetation analysis in lake sediments from central Scandinavia. *Mol. Ecol.* 22(13): 3511–3524.
- Peng, Q., Satya, R. V., Lewis, M., Randad, P., Wang, Y. (2015). Reducing amplification artifacts in high multiplex amplicon sequencing by using molecular barcodes. *BMC Genomics*. 16(1): 589.

- Pedersen, M. W., Ginolhac, A., Orlando, L., Olsen, J., Andersen, K., Holm, J., Funder, S., Willerslev, E., Kjær, K. H. (2013). A comparative study of ancient environmental DNA to pollen and macrofossils from lake sediments reveals taxonomic overlap and additional plant taxa. *Quaternary Sci. Rev.* 75: 161–168.
- Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Sarkissian, C. Der, Haile, J., Hellstrom, M., Spens, J., Thomsen, P. F., Bohmann, K., Cappellini, E., Schnell, I. B., Wales, N. A., Carøe, C., Campos, P. F., Schmidt, M. Z., Gilbert, M. T. P., Hansen, A. J., Orlando, L. and Willerslev, E. (2014). Ancient and modern environmental DNA. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 370(1660): 20130383–20130383.
- Pruesse, E., Peplies, J. and Glöckner, F.O. (2012) SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics.* 28: 1823-1829.
- Romani, A. M., Fischer, H., Mille-Lindblom, C. and Tranvik, L. J. (2006). Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: Differential extracellular enzyme activities. *Ecology.* 87(10): 2559–2569.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. and Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS.* 109(16): 6241–6246.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N. and Sharma, P. (2011). Laccase from prokaryotes: A new source for an old enzyme. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10(4): 309–326.
- Singh, P., Raghukumar, C., Verma, P. and Shouche, Y. (2012). Assessment of fungal diversity in deep-sea sediments by multiple primer approach. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28(2): 659–667.
- Stivrins, N., Kalnina, L., Veski, S. and Zeimule, S. (2014). Local and regional Holocene vegetation dynamics at two sites in eastern Latvia. *Boreal Environ. Res.* 19: 310–322.
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Pölme, S., Riit, T., Liiv, I., Kõljalg, U., Kisand, V., Nilsson, R. H., Hildebrand, F., Bork, P., Abarenkov, K. (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair- barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys.* 10: 1–43.

Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, Kõljalg, U., Yorou N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vascop-Palacois, A. M., Thu, P. Q., Suija, A., Smith, M. E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., *jt.* (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *Science*. 346: 1078.

van Geel, B., Aptroot, A. and Mauquoy, D. (2006). Sub-fossil evidence for fungal hyperparasitism (*Isthmospora spinosa* on *Meliola ellisii*, on *Calluna vulgaris*) in a Holocene intermediate ombrotrophic bog in northern-England. *Rev. Palaeobot. Palyno.* 141(1-2): 121–126.

van Geel, B., Buurman, J., Brinkkemper, O., Schelvis, J., Aptroot, A., van Reenen, G. and Hakbijl, T. (2003). Environmental reconstruction of a Roman Period settlement site in Uitgeest (The Netherlands), with special reference to coprophilous fungi. *J. Archaeol. Sci.* 30(7): 873–883.

Vancov, T., & Keen, B. (2009). Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. *FEMS Microbiol. Lett.* 296: 91–96.

William, R., & Strongman, D. (2013). Trichomycetes from Governor's Lake and Lake Micmac within the Halifax Regional Municipality, Nova Scotia, Canada. *Botany*. 91: 382-402.

Wurzbacher, C. M., Bärlocher, F., & Grossart, H. P. (2010). Fungi in lake ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 59(2): 125–149.

Kasutatud raamatud

Frenando, D. D. 2015. Pollen analysis. p. 2. *In* Dutch, S. I. (ed.), *Encyclopedia of Science*, Salem Press.

Shannon, C. E. and Weaver, W. 1964. *The mathematical theory of communication*. The University of Illinois Press, Urbana.

Wang, J. 2013. Pearson Correlation Coefficient, p. 1671. *In* W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K-H. Cho, H. Yokota (ed.), *Encyclopedia of systems biology*, Springer Science and Business Media, LLC, New York.

Kasutatud veebiaadressid

Barros, F. (2013). ANOVA and Tukey's test on R. R-bloggers: <http://www.r-bloggers.com/anova-and-tukeys-test-on-r/> (*last visited 10.03.16*)

Bates, D. (2011). Nonlinear mixed models. *Mixed models in R using the lme4 package*: <http://lme4.r-forge.r-project.org/slides/2011-01-11-Madison/6NLMMH.pdf> (*last visited 01.05.16*)

DPSP andmebaas: <http://sppadbase.ipp.cnr.it/> (*last visited 10.04.16*)

EPA. (1999). Performance Verification of Sediment Sampling Technologies. <http://www.aquaticresearch.com/EPAfact8x11.pdf> (*last visited 14.05.16*)

FIMMi koduleht:

<https://www.fimm.fi/en/services/technology-centre/sequencing/next-generation-sequencing/dna-library-preparation> (*last visited 20.02.16*)

Fox, J. and Weisberg, S. (2015) Nonlinear Mixed Models. Mixed-Effects Models in R. *An R Companion to Applied Regression*, 2nd ed:

<https://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/appendix/Appendix-Mixed-Models.pdf> (*last visited 01.05.16*)

Kindt, R. (2016). Package for Community Ecology and Suitability Analysis. Package "BiodiversityR". <https://cran.r-project.org/web/packages/BiodiversityR/BiodiversityR.pdf> (*last visited 20.03.16*)

Master Mix with GC juhend:

<https://www.neb.com/protocols/2012/09/13/protocol-for-phusion-high-fidelity-pcr-master-mix-with-gc-buffer-m0532> (*last visited 28.02.16*)

Master Mix with HF juhend:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013376_Phusion_HighFidelity_PCR_MasterMix_UG.pdf (*last visited 28.02.16*)

Mo Bio Laboratories koduleht: <https://mobio.com/powersoil-dna-isolation-kit.html>

(last visited 20.02.16)

Oksanen, J. (2016). Vegan: ecological diversity : <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf> *(last visited 14.03.16)*

Oksanen, J., Guillaume Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Wagner, H. (2016). Community Ecology Package. Package `vegan`: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> *(last visited 14.03.16)*

R Core Team (2016): <https://www.r-project.org/> *(last visited 12.03.16)*

Rootalu, K. (2014). Korrelatsioonikordajad: <http://samm.ut.ee/korrelatsioonikordajad> *(last visited 30.04.16)*

SILVA andmebaas: <http://www.arb-silva.de/> *(last visited 20.04.16)*

UNITE andmebaas: <https://unite.ut.ee/> *(last visited 20.04.16)*

Vilgalys LAB, Mycology, Duke Univeristy: <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/> *(last visited 25.05.16)*

Lisa 1. Analüüsitud setteproovidLielais Svetinu järvest

Puursüdamiku nr	Proovi nr	Sügavus esimese toru pinnalt	Bioloogiline paralleel				
				II	31	177.5	3
I	5	12.5	1	II	37	192.5	1
I	5	12.5	2	II	37	192.5	2
I	5	12.5	3	II	37	192.5	3
I	7	17.5	1	III	9	222.5	1
I	7	17.5	2	III	9	222.5	2
I	7	17.5	3	III	9	222.5	3
I	11	27.5	1	III	15	237.5	1
I	11	27.5	2	III	15	237.5	2
I	11	27.5	3	III	15	237.5	3
I	17	42.5	1	III	21	252.5	1
I	17	42.5	2	III	21	252.5	2
I	17	42.5	3	III	21	252.5	3
I	23	57.5	1	III	33	282.5	1
I	23	57.5	2	III	33	282.5	2
I	23	57.5	3	III	33	282.5	3
I	29	72.5	1	III	39	297.5	1
I	29	72.5	2	III	39	297.5	2
I	29	72.5	3	III	39	297.5	3
I	31	77.5	1	IV	5	312.5	1
I	31	77.5	2	IV	5	312.5	2
I	31	77.5	3	IV	5	312.5	3
I	35	87.5	1	IV	11	327.5	1
I	35	87.5	2	IV	11	327.5	2
I	35	87.5	3	IV	11	327.5	3
II	7	117.5	1	IV	17	342.5	1
II	7	117.5	2	IV	17	342.5	2
II	7	117.5	3	IV	17	342.5	3
II	13	132.5	1	IV	23	357.5	1
II	13	132.5	2	IV	23	357.5	2
II	13	132.5	3	IV	23	357.5	3
II	19	147.5	1	IV	29	372.5	1
II	19	147.5	2	IV	29	372.5	2
II	19	147.5	3	IV	29	372.5	3
II	25	162.5	1	IV	35	387.5	1
II	25	162.5	2	IV	35	387.5	2
II	25	162.5	3	IV	35	387.5	3
II	31	177.5	1	V	1	402.5	1
II	31	177.5	2	V	1	402.5	2
				V	1	402.5	3
				V	7	417.5	1
				V	7	417.5	2

V	7	417.5	3	VI	27	567.5	3
V	13	432.5	1	VI	33	582.5	1
V	13	432.5	2	VI	33	582.5	2
V	13	432.5	3	VI	33	582.5	3
V	19	447.5	1	VI	39	597.5	1
V	19	447.5	2	VI	39	597.5	2
V	19	447.5	3	VI	39	597.5	3
V	25	462.5	1	VII	5	612.5	1
V	25	462.5	2	VII	5	612.5	2
V	25	462.5	3	VII	5	612.5	3
V	37	492.5	1	VII	11	627.5	1
V	37	492.5	2	VII	11	627.5	2
V	37	492.5	3	VII	11	627.5	3
VI	3	507.5	1	VII	17	642.5	1
VI	3	507.5	2	VII	17	642.5	2
VI	3	507.5	3	VII	17	642.5	3
VI	9	522.5	1	VII	19	647.5	1
VI	9	522.5	2	VII	19	647.5	2
VI	9	522.5	3	VII	19	647.5	3
VI	13	532.5	1	VII	21	652.5	1
VI	13	532.5	2	VII	21	652.5	2
VI	13	532.5	3	VII	21	652.5	3
VI	15	537.5	1	VII	23	657.5	1
VI	15	537.5	2	VII	23	657.5	2
VI	15	537.5	3	VII	23	657.5	3
VI	17	542.5	1	VII	29	672.5	1
VI	17	542.5	2	VII	29	672.5	2
VI	17	542.5	3	VII	29	672.5	3
VI	19	547.5	1	VII	35	687.5	1
VI	19	547.5	2	VII	35	687.5	2
VI	19	547.5	3	VII	35	687.5	3
VI	21	552.5	1	VIII	2	705	1
VI	21	552.5	2	VIII	2	705	2
VI	21	552.5	3	VIII	2	705	3
VI	23	557.5	1	VIII	8	720	1
VI	23	557.5	2	VIII	8	720	2
VI	23	557.5	3	VIII	8	720	3
VI	25	562.5	1	VIII	16	740	1
VI	25	562.5	2	VIII	16	740	2
VI	25	562.5	3	VIII	16	740	3
VI	27	567.5	1	Kokku erinevaid settekihte	54	Proovide koguarv	162
VI	27	567.5	2				
VI	27	567.5	3				

Lisa 2. FIMMi protokoll

PCR PROTOCOL – to create an Illumina compatible amplicon library in two steps

PCR with locus specific primers (including Illumina adapter tails)

Component	1x reaction	Final conc.
2x Phusion Master Mix	10 µl	1x
Locus specific primer F (5 µM)	2 µl	0,5 µM
Locus specific primer R (5 µM)	2 µl	0,5 µM
Template DNA (10ng/µl)	1 µl	
H ₂ O	5 µl	
Total volume	20 µl	

PCR program

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98 °C	30 s	
Denaturation	98 °C	10 s	
Annealing	X °C	30 s	27-30
Extension	72 °C	15 s	
Final extension	72 °C	10 min	
	4 °C	Hold	

PCR to add P5/P7 tails

Component	1x reaction	Final conc.
2x Phusion Master Mix	10 µl	1x
Mplex PCR primer 1.0 (25 µM)	0,4 µl	0,5 µM
Long PCR primer index X (5 µM)	2 µl	0,5 µM
PCR product (15 ng/µl)	1 µl	
H ₂ O	5 µl	
Total volume	20 µl	

For this PCR 15 ng of DNA is enough. PCR product usually needs to be diluted 10-100 times.
The diluted PCR product is used for this reaction.

PCR program

Cycle step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	98 °C	2 min	
Denaturation	98 °C	20 s	12
Annealing	65 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
Final extension	72 °C	5 min	
	4 °C	Hold	

Lisa 3. PCRi optimeerimise tulemusena koostatud protokoll seenekoosluste tuvastamiseks. Protokoll koostamise aluseks oli algne FIMMi protokoll.

PCR I aste lookuse spetsiifiliste praimeritega (sisaldades ka Illumina adapetereid)

Koostisosa	ITS2 ala praimerite puhul		18S rDNA ala praimerite puhul	
	1x reaktsioon	lõppkontsentratsioon	1x reaktsioon	lõppkontsentratsioon
2x Phusion Master Mix ¹	10 µl	1x	10 µl	1x
Lookuse spetsiifiline praimer F (10µM)	1,5 µl	0,75 µM	1 µl	0,5 µM
Lookuse spetsiifiline praimer R (10µM)	1,5 µl	0,75 µM	1 µl	0,5 µM
BSA (20 mg/ml)	1 µl	1 mg/ml	0,75 µl	0,75 mg/ml
ekstraheeritud DNA	1,5 µl		1 µl	
H2O	4,5 µl		6,15 µl	
DMSO (~100%)	-		0,1 µl	0,5 %
Reaktsioonisegu maht	20 µl		20 µl	

PCR I astme programm

Tsükli järk	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Esmane denaturatsioon	98 °C	30 s	
Denaturatsioon	98 °C	10 s	
Praimerite seondumine ²	46°C/52,5°C	30 s	30
Süntees	72°C	15 s	
Lõpu süntees	72°C	10 min	
Lõpptemperatuur	10°C		

PCR II aste P5/P7 adapterite lisamiseks

Koostisosa	1x reaktsioon	lõppkontsentratsioon
2x Phusion Master Mix		
with HF Buffer	10 µl	1x
Mplex PCR praimer (25 µM)	0,4 µl	0,5 µM
Long PCR praimer indeks X (2,5 µM)	2 µl	0,25 µM
PCR I astme produkt	1 µl	
H2O	6,6 µl	
Reaktsioonisegu maht	20 µl	

¹ ITS2 ala praimerite puhul 2x Phusion Master Mix with HF segu

18S rDNA praimerite puhul 2x Phusion Master Mix with GC segu

² ITS2 praimerite puhul kasutati temperatuuri 46°C ja 18S rDNA praimerite puhul 52,5°C

PCR II astme programm

Tsükli järk	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Esmane denaturatsioon	98 °C	2 min	
Denaturatsioon	98 °C	20 s	12
Praimerite seondumine	65°C	30 s	
Süntees	72°C	30 s	
Lõpu süntees	72°C	5 min	
Lõpptemperatuur	10°C		

Lisa 4. Andmestikest tuvastatud OTUde arvud ja suuremad taksonoomilised grupid

Tabel 1. 18S rDNA andmetest tuvastatud OTUde jaotumine suuremateks taksonoomilisteks gruppideks

18S andmestiku OTUd						
Alveolata	Excavata	Amoebozoa	Rhizaria	Archaeplastida	Cryptophyceae	Stramenopiles
453	114	33	223	1314	4	339
Haptophyta	Fungi	LKM11	LKM15	Rozella	Holozoa	määramata
1	847	126	5	10	358	201

Tabel 2. 18S seente andmetest tuvastatud OTUde jaotumine sugukonna tasemel

18S rDNA seente OTUd						
Ascomycota	Basidiomycota	Chytridio mycota	Neocallimastigo mycota	Zygomycota	Blastocladio mycota	määramata
250	447	86	3	31	4	26

Tabel 3. ITS2 andmetest tuvastatud OTUde jaotumine sugukonna tasemel

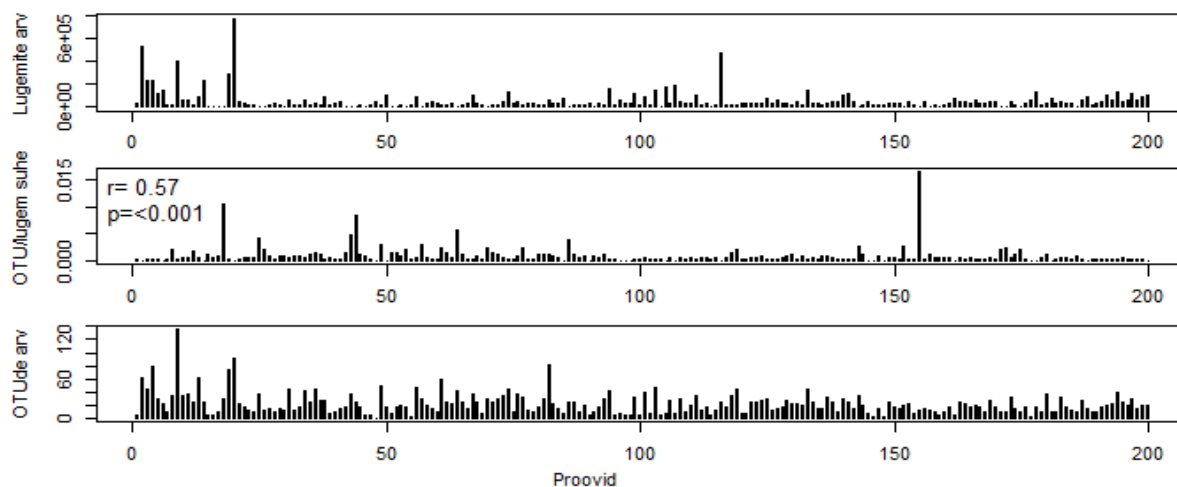
ITS2 andmestiku OTUd							
Ascomycota	Basidio mycota	Chytridio mycota	Neocallimastigo mycota	Zygomycota	Glomero mycota	Rozello mycota	määramata
1485	958	156	1	34	128	153	1554

Tabel 4. ITS2, 18S rDNA ja seente 18s rDNA andmetest tuvastatud kogu OTUde ja lugemite arv

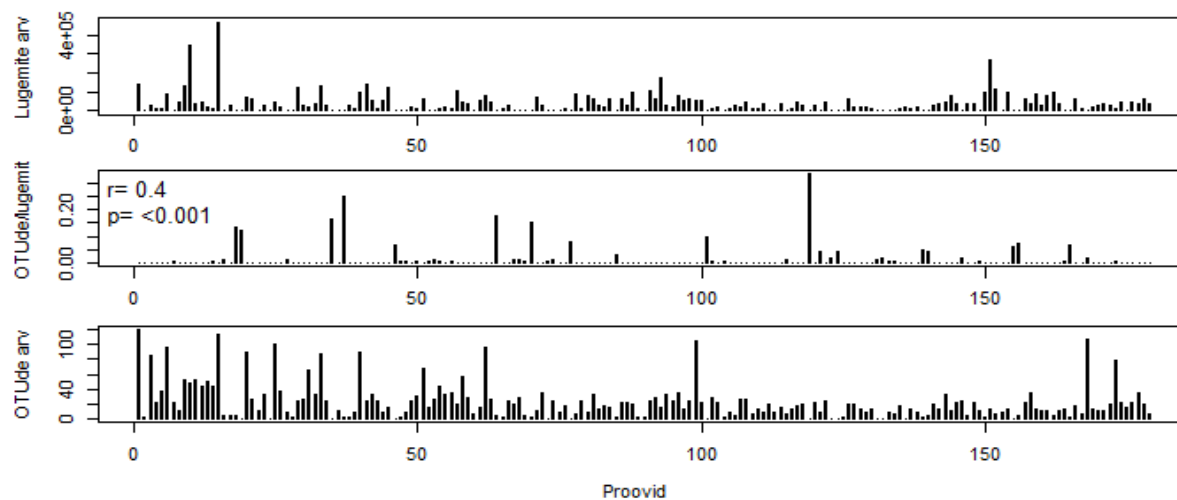
	ITS2	18S DNA	Seenete 18S rDNA
Kogu OTUde arv	4469	4028	847
Kogu lugemite arv	11 046 895	6 854 765	1 361 520

Lisa 5. OTUde ja lugemite suhe erinevates andmestikes

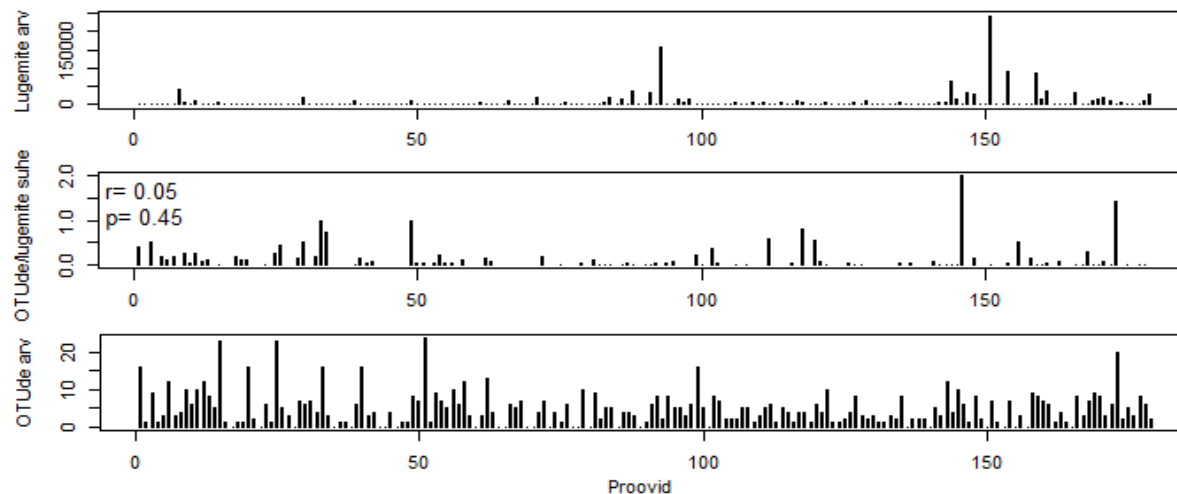
ITS andmestiku OTUde ja lugemite arv proovides



18S andmestiku OTUde ja lugemite arv proovides



18S andmestiku seente OTUde ja lugemite arv proovides



Lisa 6. Chao1 ja ACE indeksid. Indeksid on arvatatud 3 bioloogilise paralleeli kohta kokku

	18S rDNA andmestiku liigirikkuse indeksid				ITS2 andmestiku liigirikkuse indeksid			
	S.chao1	se.chao1	S.ACE	se.ACE	S.chao1	se.chao1	S.ACE	se.ACE
I 11	121	0	121	2,733327	170	0	170	3,464951
I 17	108	0	108	2,183694	101	0	101	2,375619
I 23	117	0	117	2,882307	13	0	#N/A	#N/A
I 29	94	0	94	3,116531	152	0	152	4,167544
I 31	58	0	58	2,319334	30	0	30	0,983192
I 35	101	0	101	4,148243	55	0	55	1,388262
I 5	182	0	182	6,695907	94	0	94	3,346958
I 7	121	0	121	4,639037	108	0	108	1,962614
II 13	98	0	98	4,195479	34	0	#N/A	#N/A
II 19	102	0	102	4,907977	64	0	64	2,146946
II 25	100	0	100	3,128898	8	0	#N/A	#N/A
II 31	65	0	65	2,3337	70	0	70	1,942017
II 37	21	0	21	1,345185	59	0	59	0,991489
II 7	44	0	44	2,558409	70	0	70	0,992831
III 15	91	0	91	0,99449	97	0	97	1,399558
III 21	74	0	74	2,348087	68	0	68	2,505875
III 33	47	0	47	1,383797	60	0	#N/A	#N/A
III 39	106	0	106	0,995272	78	0	78	1,395965
III 9	32	0	32	1,648863	35	0	#N/A	#N/A
IV 11	46	0	46	3,387958	52	0	52	1,681346
IV 17	43	0	43	1,904707	111	0	111	2,382368
IV 23	24	0	#N/A	#N/A	35	0	#N/A	#N/A
IV 29	30	0	30	0,983192	50	0	50	1,385641
IV 35	32	0	32	1,648863	34	0	34	1,371989
IV 5	52	0	52	2,125848	74	0	#N/A	#N/A
V 1	30	0	#N/A	#N/A	77	0	77	3,384456
V 13	38	0	38	1,376494	54	0	54	3,509247
V 19	75	0	75	1,39523	33	0	33	0,984732
V 25	131	0	131	4,427534	46	0	#N/A	#N/A
V 37	49	0	49	2,710524	75	0	75	2,94392
V 7	26	0	26	1,358732	42	0	42	1,669046
VI 13	35	0	35	2,070197	60	0	60	2,32379
VI 15	33	0	33	0,984732	81	0	81	2,828427
VI 17	35	0	35	1,373213	27	0	27	1,632993
VI 19	43	0	43	0,988304	60	0	60	2,140872
VI 21	23	0	#N/A	#N/A	55	0	#N/A	#N/A
VI 23	39	0	39	1,664101	55	0	55	1,388262
VI 25	14	0	#N/A	#N/A	19	0	19	0,973329
VI 27	25	0	25	1,83303	51	0	#N/A	#N/A
VI 3	15	0	#N/A	#N/A	70	0	70	2,50998

VI 33	21	0	21	1,603567	42	0	42	1,380131
VI 39	24	0	24	1,354006	30	0	30	0,983192
VI 9	54	0	54	1,387777	38	0	38	1,891811
VII 11	46	0	46	2,978182	54	0	54	2,468318
VII 17	34	0	34	1,653872	53	0	53	2,306676
VII 19	26	0	26	0,980581	35	0	35	1,656157
VII 21	35	0	35	2,898275	55	0	55	1,9259
VII 23	60	0	60	3,425395	41	0	41	2,409331
VII 29	27	0	27	1,632993	37	0	37	1,660348
VII 35	19	0	#N/A	#N/A	46	0	46	1,911066
VII 5	50	0	50	0,989949	45	0	#N/A	#N/A
VIII 16	66	0	#N/A	#N/A	51	0	51	0,990148
VIII 2	27	0	27	0,981307	44	0	44	3,026399
VIII 8	108	0	108	3,143188	75	0	75	3,625833

Lisa 7. Nonlinear Mixed-Effects Models tulemused

18S rDNA andmed

Mudel1: OTU~sügavus + Biol				
	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	171	81.52965	<.0001
Sügavus	1	171	19.82012	<.0001
Biol	2	171	4.13887	0.0176

Mudel2: Shannon~sügavus + Biol				
	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	171	86.14732	<.0001
Sügavus	1	171	0.16704	0.6833
Biol	2	171	0.04438	0.9566

18S rDNA seente andmed

Mudel1: OTU~sügavus + Biol				
	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	171	64.77522	<.0001
Sügavus	1	171	2.90418	0.0902
Biol	2	171	2.76507	0.0658

Mudel2: Shannon~sügavus + Biol				
	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	171	62.15004	<.0001
sügavus	1	171	0.07838	0.7798
Biol	2	171	5.27484	0.0060

ITS2 andmed

Mudel1: OTU~sügavus+ Biol+ meetod				
	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	188	107.09559	<.0001
sügavus	1	188	20.43445	<.0001
Biol	2	188	13.33886	<.0001
meetod	2	188	1.89536	0.1531

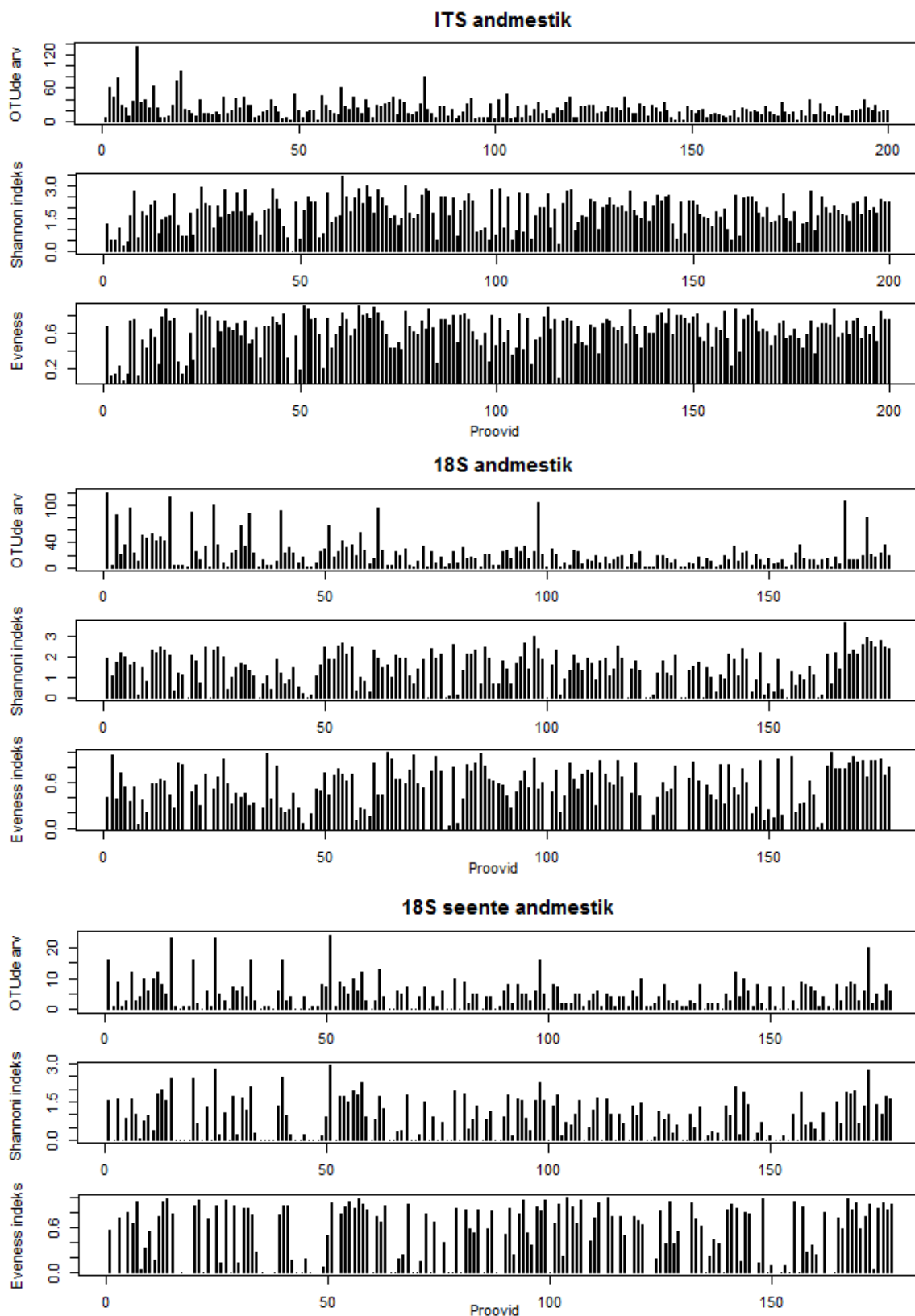
Mudel2: Shannon ~sügavus+ Biol+ meetod				
	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	188	61.69025	<.0001
sügavus	1	188	0.13874	0.7100
Biol	2	188	16.67887	<.0001
meetod	2	188	2.79545	0.0636

Lisa8. 18S rDNA ala abil kirjeldatud liigrikkus. Graafikul on näha suuremad grupid ja nende hierarhiline jaotuvus. Interaktiivselt saab graafikut uurda tööle lisatud failidest.



Lisa 9. OTUde arvu, Shannoni ja Evenessi indeksite muutused erinevates proovides.

Proovid paiknevad järjest sügavuse kasvu järjekorras, 3 bioloogilist paralleeli järjest. Esimene proov on sügavusel 412,5 cm veepinnalt ja viimane proov sügavusel 1140 cm.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Liisi Talas

(sünnikuupäev: 05.09.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“Seenekoosluste tuvastamine jääajajärgsetest järve põhjasetetest 18S rDNA ja ITS ala praimerite põhise meetodiga”, mille juhendaja on Veljo Kisand.

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **27.05.16**